

ROSANA HERMINIA SCOLA

ESTUDO DOS VACÚOLOS SUGESTIVOS DE CORPOS DE INCLUSÃO CITOPLASMÁTICA NA BIÓPSIA MUSCULAR.

Análise clínica, laboratorial, eletroneuromiográfica,
histoquímica, imunocitoquímica e ultra-estrutural de 16 casos.

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós-Graduação em Medicina In-
terna — Mestrado do Setor de Ciências da
Saúde da UFPR, como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre.

CURITIBA

1993

Orientador:
Dr. LINEU CESAR WERNECK

Aos meus pais Hélio e N yr,   av  Ana,
pela vida e compreensão,   irmã Alzira,
pela colaboração e amizade .

Em especial ao Dr. Lineu pelo apoio
inestimável.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. **Lineu César Werneck**, Professor Titular de Neurologia do Departamento de Clínica Médica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e Chefe da Especialidade de Neurologia, pelo orientação e empenho na realização deste estudo.

Ao Dr. **Waldemiro Grenski**, Diretor do Setor de Ciências Biológicas e ao Centro de Microscopia Eletrônica em especial a Mestranda da Biologia Celular **Célia Regina Cavichiolo Franco**, pela amizade, colaboração, e empenho na realização da microscopia eletrônica. À Sra **Vera Regina Piontek** pela ajuda nas ampliações e reproduções das fotografias.

Ao Dr. **Guilberto Minguetti**, pelo auxílio na escolha e interpretação das fotos de microscopia eletrônica.

À Dra. **Iara Taborda de Messias**, Chefe do Setor de Imunologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e a Dra. **Luine Vidal Tsuchiya**, Bioquímica do Banco de Sangue e estagiária do setor de Imunologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, pela realização das técnicas de imunofluorescência.

À Srta. **Sumico Nakagava** e Srta. **Angela M. Chiquito**, pela dedicação na execução das técnicas de biópsias e histoquímica.

Ao Dr. **Paulo Tadeu Rodrigues de Almeida** Chefe do Banco de Sangue do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná pelo empréstimo do microscopio de epi-iluminação.

Aos Drs. **Acyr Rachid**, **Alexandre Luis Longo**, **Carlo Domenico Marroni**, **Paulo R .R. Moreira** e **Ylmar Corrêa Neto** que contribuíram para realização deste estudo.

Aos professores **Carlos E.S. Silvado**, **Duilton de Paola**, **Edison M. Nývák**, **Ehrenfried O. Wittig**, **Guilberto Minguetti**, **Haydée Abdala**, **Maria Thereza da Silveira**, **Octávio A. da Silveira** e aos colegas **Leila E. Ferraz**, **Hélio A.G. Teive** e **Mara Ozita Balliana** pela colaboração e incentivo.

As Sras **Ligia Simão**, **Sirlei Moura** e demais Funcionárias do Serviço de Métodos Neurológicos pela dedicação e colaboração.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, em nome de seus Diretores Drs. **Osmar Martins, Jairo Sponholz Araújo e Leonel Cúrcio Jr.** que possibilitaram a realização deste estudo.

Ao Professor **Orlando Bogo**, Professor de Língua Portuguesa da Pontifícia Universidade Católica pela revisão gramatical do texto.

Ao Dr. **Roberto Pirajá Araújo**, Professor Coordenador do Mestrado da Medicina Interna, do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná pelo incentivo.

Aos Médicos-Residentes da Especialidade de Neurologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná pela realização das biópsias musculares e atendimento aos paciente.

A Sras. **Vera Lúcia Chagas, Selma Regina Conte, Maria Rita de Araújo** e demais funcionária da Biblioteca do Setor de Saúde da Universidade Federal do Paraná pelo auxílio na aquisição de artigos e revisão bibliográfica.

A Fundação da Universidade Federal do Paraná - DCTC (Projeto 64/92) pelo auxílio financeiro parcial.

Aos Professores **Severino Rigo** e Dr. **Paulo Ricardo Mattana** pelo incentivo e influência na formação estudantil e acadêmica (Caxias do Sul-RS).

SUMÁRIO

RESUMO V

SUMMARY VI

INTRODUÇÃO 1

VACÚOLOS 2

Classificação 2

Conteúdo 2

Formação 3

Tipos 3

Acúmulo 3

Autofágicos 3

Marginados 4

VACÚOLOS MARGINADOS E FILAMENTOS NUCLEARES E CITOPLASMÁTICOS 5

ASSOCIAÇÃO DE CORPOS DE INCLUSÃO CITOPLASMÁTICA E OUTRAS DOENÇAS 9

OBJETIVOS 11

MATERIAIS E MÉTODOS 12

CASUÍSTICA 13

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL 20

ELETRONEUROMIOGRAFIA 21

BIÓPSIA MUSCULAR 22

Histoquímica e cortes a fresco 23

Imunocitoquímica 25

Microscopia eletrônica de transmissão 27

Caracterização diagnóstica 28

RESULTADOS 31

DIAGNÓSTICO 31

INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL 31

ELETRONEUROMIOGRAFIA 32

BIÓPSIA MUSCULAR 34

Histoquímica 34

Imunocitoquímica 47

Microscopia eletrônica de transmissão 58

COMENTÁRIOS 66

CORPOS DE INCLUSÃO CITOPLASMÁTICA 66

ENZIMAS SÉRICAS 68

ELETROMIOGRAFIA 69

CONDUÇÕES NERVOSAS 70

BIÓPSIA MUSCULAR 70

MICROSCOPIA ELETRÔNICA 72

IMUNOCITOQUÍMICA 74

ASPECTOS CLÍNICOS 77

CONCLUSÕES 80

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

RESUMO

Os vacúolos são formações anormais encontradas nas fibras musculares, podendo ser classificados morfolologicamente quanto ao tamanho, número, posição, forma, presença de membranas e se marginados ou não. Os vacúolos marginados, podem ser encontrados em diversas doenças, entre elas a miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Esta é caracterizada clinicamente como uma polimiosite crônica tendo na histologia do músculo a presença dos vacúolos marginados, e denominados histologicamente de corpos de inclusão citoplasmáticos, podendo ter filamentos intranucleares e intracitoplasmáticos.

Com o objetivo de estudar os vacúolos com aspecto histológico de corpos de inclusão citoplasmática, foram estudados todos os casos entre 1400 biópsias musculares que apresentaram os mesmos, procurando correlacionar com os dados clínicos laboratoriais, afim de verificar a sua especificidade para determinadas doenças. Foram encontrados 16 casos.

Dos 16 casos, a idade média foi de 36.0 anos, o início da doença teve a média de 20.5 anos e o tempo de doença de 5.5 anos. Os casos foram classificados conforme a história clínica, hereditariedade, dados laboratoriais, eletrofisiológicos, histoquímicos, imunocitoquímicos e microscopia eletrônica em miosite com corpos de inclusão citoplasmática (4 casos), atrofia muscular espinhal juvenil (6 casos), miopatias distais (3 casos), distrofia de cinturas pélvica e escapular (2 casos) e polineuropatia periférica (1 caso).

As enzimas musculares, mais especificamente a creatinoquinase mostrou-se elevada em dez casos. Apenas um caso mostrou moderada redução nas conduções nervosas. A eletromiografia esteve alterada em todos os casos sendo que, em cinco, casos a mesma mostrou sinais de desinervação (ativa e ou crônica), oito foram miopáticos e em dois casos mista (neuromiopática).

A biópsia muscular pela histoquímica em cinco casos mostrou histologicamente uma miopatia (ativa e ou crônica); em sete casos, elementos para miopatia e desinervação (misto); em dois casos, desinervação; e em dois casos, miopatia inflamatória. Todos os casos mostravam vacúolos marginados.

O estudo imunocitoquímico demonstrou predomínio de linfócitos CD8+ no interstício na maioria dos casos, e ocasionalmente nas regiões perivasculares e no interior das fibras musculares. As miosites por corpos de inclusão citoplasmática

tiveram importante aumento de linfócitos CD8+, em relação a outras doenças. A detecção de imunoglobulinas e complemento foram mais evidentes na miosite com corpos de inclusão citoplasmática, embora não demonstre uma diferença marcante, exceto na polineurite em que não teve nenhuma célula ou deposição de imunoglobulina.

A microscopia eletrônica demonstrou a presença de filamentos nucleares e dispersos no citoplasma em cinco casos, um caso demonstrou a presença de filamentos no núcleo e região subsarcolemal, dois casos mostraram filamentos na região subsarcolemal e citoplasma. Em um caso, os filamentos estavam dispersos no citoplasma e núcleo, sendo que em sete casos não foram observados filamentos intracitoplasmáticos ou intranucleares.

Foi concluído que: 1) Os filamentos intracitoplasmáticos e intranucleares não são específicos para uma única entidade; 2) A presença de reação inflamatória auxilia na diferenciação das outras doenças com miosite com corpos de inclusão citoplasmática; 3) A creatinaquinase e eletromiografia não são úteis para diferenciar a miosite com corpos de inclusão citoplasmática das outras entidades; 4) Existe um predomínio de linfócitos T no interstício nas miopatias com corpos de inclusão citoplasmática; 5) Foi notado importante aumento de linfócitos CD8+ no interstício, sugerindo relação com o complexo maior de histocompatibilidade 1 (MCH1); 6) Houve inversão da proporção de linfócitos CD4+/CD8+, sugerindo processo mediado pelo MCH1; 7) As imunoglobulinas e complemento foram detectadas com maior frequência nas miosites com corpos de inclusão citoplasmática; 8) Os corpos de inclusão citoplasmática ocorrem em diversas entidades, com patogenia e patologia global diferente, sugerindo se tratar de uma reação celular inespecífica, talvez relacionada com tempo de agressão crônica da fibra muscular, tanto nos processos de origem muscular primária, como de origem neurogênica.

SUMMARY

The vacuoles are abnormal structures of the muscle fibers, who can be morphological classified according the size, number, location, shape, presence of membranes or if they are rimmed. The rimmed vacuoles can be find in several diseases, mainly in the inclusion body myositis. This disease can be presented as chronic polymyositis with rimmed vacuoles in the histology, also called cytoplasmatic inclusion body, with cytoplasmatic or nuclear filaments.

With the objectives to study the histopathological aspects of the cytoplasmatic inclusion bodies, we select all the cases who presented rimmed vacuoles among 1400 muscle biopsies, who had the clinical history and laboratory investigation available.

We found 16 cases, with mean age of 36.0 years, whose disease started at 20.5 and a mean disease time 5.5 years. The cases where classified regarding the clinical history, hereditary pattern, serum laboratory determinations, electrophysiological tests, histochemical and immunocytochemical analysis and electron microscopic findings in inclusion body myositis (4 cases), juvenile spinal muscular atrophy (6 cases), distal myopathy (3 cases), limb-girdle muscular dystrophy (2 cases) and peripheral neuropathy of unknown etiology (1 case).

The serum enzymes, specially the creatinekinases, was increased in ten cases. Only one case had reduced nerve conduction velocity. The electromyography was abnormal in all cases with denervation pattern in five and myopathic pattern in eight and in two cases had a mixed pattern (myopathic and denervation).

The muscle biopsy histochemistry had the diagnosis of myopathy (active and chronic) in seven cases, mixed (myopathy and denervation findings) in two cases, denervation in two and inflammatory myopathy in two. All the cases had rimmed vacuoles.

The immunocytochemical analysis showed CD8+ lymphocytes in the interstitial in most cases, occasionally in the perivascular region and rarely inside the muscle fibers. The inclusion body myositis cases had increased of CD8+ lymphocytes comparing with the other diseases. The immunoglobulins and complement deposition were slight more intense in the inclusion body myositis, comparing with the other diseases. The peripheral neuropathy had no cells or immunoglobulins found any time.

The electron microscopy detected filaments in the nucleus and diffusely in the cytoplasm in five cases, one case only in the nucleus and sub-sarcolemmal region, two cases with filaments in the sub-sarcolemmal and cytoplasm. One case had filaments where dispersed in the cytoplasm and nucleus. Seven cases had no filaments found in nucleus or cytoplasm.

The following conclusion was drawn: 1) The intracytoplasmic or intranuclear filaments is not specific for only one disease. 2) The inflammatory reaction help in the differentiation of the inclusion body myositis from the other diseases studied. 3) The creatinekinase and electromyography where useless in the differentiation the inclusion body myositis from other diseases. 4) A predominance of T lymphocytes was found in the interstitial tissue in the cases of inclusion body myositis. 5) Was noted an important increased of the CD8+ lymphocytes in the interstitial tissue, suggesting a relationship with the major histocompatibility 1 complex (MCH1). 6) An inversion of the CD4+/CD8+ lymphocyte's proportion was found , suggesting a mediation by the MCH1. 7) The immunoglobulins and complement deposition were found with major frequency in the inclusion body myositis. 8) The cytoplasmatic inclusion bodies can be found in several diseases with different pathogenesis and pathology, suggesting a non specific cellular reaction, maybe related with the time of the chronic aggression to the muscle tissue, who can be similar in the primary muscle lesion and neurogenic etiology.

INTRODUÇÃO

Os primeiros relatos da realização da biópsia muscular datam de 1864, quando Wernich faz uma biópsia numa criança do sexo masculino de 11 anos, que apresentava paralisia muscular pseudohipertrófica. Após este relato inicial, no ano seguinte foram feitas outras biópsias por Griesinger e Heller, difundindo o método [DUCHENNE, 1868; GRIENSINGER, 1865].

Embora Duchenne tenha procurado sistematizar os dados na distrofia muscular que leva o seu nome, foi somente Erb em 1891, que estudando diversos tipos de distrofias musculares progressivas, descreveu as principais alterações encontradas nas miopatias primárias, que serviram como fundamento da anatomia patológica muscular [DUCHENNE, 1968; ERB, 1891].

Em 1955, Wachstein & Meisel realizam pela primeira vez a histoquímica muscular no tecido humano, que até então era indentificado apenas pela parafina, que não possibilitava a identificação das reações enzimáticas do músculo [WACHSTEIN & MEISEL, 1955].

Gradativamente, o estudo da patologia muscular foi se aperfeiçoando com a introdução na rotina diagnóstica de técnicas de histoquímica, microscopia eletrônica e imunocitoquímica, permitindo identificar diversas estruturas e ultraestruturas normais e patológicas encontradas no tecido muscular, possibilitando ampliar os diagnósticos patológico e nosológico das doenças neuromusculares [BECKETT & BOURNE, 1957a; BECKETT & BOURNE 1957b; BECKETT & BOURNE 1958a; BECKETT & BOURNE 1958b; DUBOWITZ, 1985; FITZSIMON & SEWRY, 1985; MAIR & TOMÉ 1972].

Entre as inúmeras estruturas que foram identificadas pelos métodos histológicos, histoquímicos, microscopia eletrônica e imunocitoquímica, estão os vacúolos, que possuem funções, estrutura e patogenia diferentes, conforme a sua origem e estímulo para sua formação.

VACÚOLOS

Chamamos de vacúolos a formação anormal de espaços ou cavidades que alteram a estrutura da organização miofibrilar. Essas estruturas devem ser observadas pelo menos por um método de coloração e, às vezes, pode ser observado o depósito de material dentro destas cavidades, que é identificado com o auxílio da histoquímica [ENGEL, 1972; ENGEL & BANKER, 1986a; ENGEL & BANKER, 1986b].

Quando os vacúolos predominam na biópsia muscular, anatomopatologicamente o espécime é classificado como miopatia vacuolar, como na paralisia periódica hipocalêmica e, em outros casos a presença do mesmo é pouco específica como na distrofia oculofaringéia. No entanto, os vacúolos nos músculos representam uma alteração comum e são achados numa variedade de doenças, sendo muitas vezes inespecífico [ENGEL, 1972; ENGEL & BANKER, 1986a].

CLASSIFICAÇÃO

Os vacúolos podem ser classificados morfollogicamente conforme seu tamanho em grandes e pequenos, conforme a forma, em marginados e livres; conforme o número em únicos e múltiplos; conforme a posição na fibra muscular, em periféricos e centrais; conforme o tipo de membranas que o circunda em contínuas, podendo não possuir membranas [ENGEL, 1972].

CONTEÚDO

A determinação do conteúdo do vacúolo é importante, pois define muitas vezes qual a estrutura celular que está envolvida. O conteúdo pode ser formado por organelas normais degradadas, produtos da degradação do citoplasma, formação de estruturas anormais nas células, glicogênio, substâncias ácidas mucóides, lipídios e líquidos com ou sem comunicação com o espaço extracelular. Pode também haver a combinação dos materiais acima e também, muitas vezes, o material não é definido [ENGEL, 1972].

A presença de material oriundo da degeneração do citoplasma é observado na deficiência de maltase ácida, na paralisia periódica, na distrofia oculofaringéia e miosite por corpos de inclusão citoplasmática. Nenhum tipo específico de vacúolo é diagnóstico de determinada doença, mas certos tipos estão associados com determinadas patologias. As características dos vacúolos podem mudar conforme a evolução da doença, como ocorre com outras organelas celulares frente aos diferentes estímulos patogênicos que agridem a fibra muscular [ENGEL & BANKER, 1986a].

FORMAÇÃO

Quanto a formação, os vacúolos pode ser oriundos da degeneração sarcotubular como ocorre na paralisia periódica, acúmulo de material que não consegue ser devidamente metabolizado como glicogênio e lipídios e, vacuolização decorrente dos processos autofágicos como ocorre na dermatomiosite, polimiosite, miosites por corpos de inclusão citoplasma, distrofia miotônica, miopatias distais, distrofia oculofaringéia. [ENGEL, 1972; ENGEL & BANKER, 1986b; CULLEN & COL., 1992].

TIPOS DE VACÚOLOS

1. VACÚOLOS DE ACÚMULO.

Os lipídios (triglicerídeos e ácidos graxos) são as substâncias que se acumulam com maior frequência na fibra muscular, formando vacúolos. As fibras musculares normalmente contêm pequenas coleções de lipídios, principalmente nas fibras do tipo 1. Estas coleções podem aumentar em pacientes obesos ou com distúrbio do metabolismo mitocondrial e lipídico, formando microvacúolos ou vacúolos maiores. Eles são melhor detectados por cortes com criostato e colorações para gordura, diferindo dos vacúolos autofágicos por não conterem membranas e autofágia. Outro material normalmente observado é o glicogênio, observado em forma de grânulos e principalmente nas fibras musculares tipo 2. Em condições anormais, o glicogênio tende a acumular em todas as partes da fibra, quando desaparecem as outras organelas, para preencher os espaços vazios. Assim, na deficiência de maltase ácida, há grande acúmulo, principalmente nas formas infantis, onde a grande quantidade de glicogênio livre no citoplasma comprime, desloca e substitui as organelas preexistentes. Mais raramente, este acúmulo se faz em reservatórios circundados por membranas ou em vacúolos autofágicos, formados por membranas derivadas do sistema T e cisterna de Golgi [ENGEL & BANKER, 1986a; CULLEN & COL., 1992; ENGEL, 1972].

2. VACÚOLOS AUTOFÁGICOS

Os vacúolos autofágicos são formados por produtos da vacuolização autofágica, sendo secundários a ativação dos lisossomas e seus enzimas. O músculo esquelético contém somente pequenas estruturas lisossomais identificadas pela fosfatase ácida na região próxima ao núcleo, na dobra juncional e citoplasma da junção neuromuscular. As enzimas lisossomais são sintetizadas no retículo endoplasmático, processadas pelo aparelho de Golgi e liberadas primeiramente

para os lisossomas através da cisterna de Golgi. Quando as enzimas lisossomais são liberadas para os espaços das membranas que contêm material citoplasmático sequestrado, estes espaços transformam-se em lisossomas secundários ou vacúolos autofágicos. Inicialmente ocorre o englobamento de pequenas áreas do citoplasma, gradualmente os espaços entre as membranas aumentam, e fundem-se, tornando-se maiores, coalescem e transformam-se em grandes vacúolos autofágicos. Posteriormente, o material dos vacúolos é transferido para a superfície da membrana e ocorre exocitose do seu conteúdo. Alguns vacúolos, principalmente aqueles que contêm material uniforme (grânulos de glicogênio), raramente liberam seu material para o exterior. Outros fechados, contendo organelas parcialmente degradadas tornam-se um estágio intermediário, matriz e organelas e no final apenas matriz amorfa (paralisia periódica, síndromes miastênicas e ocasionais em polimiosites) [ENGEL, 1972; ENGEL & BANKER, 1986b].

Diversos estímulos promovem a formação dos vacúolos autofágicos. Estes incluem deficiência de enzima lisossomal (maltase ácida); degradação prejudicada de conteúdo lisossomal por um aumento do pH lisossomal (miopatia da cloroquina); inibição do catabolismo dos fosfolipídeos (miopatia da vincristina). Em cada um destes fatores, o estímulo para proliferação do lisossoma é decorrente de um defeito na digestão ou no controle da ativação dos lisossomas. Em outras doenças como a paralisia periódica, miopatia por emetina, miopatias inflamatórias e distrofias musculares, existe uma degradação extralisossomal de organelas, que parece ser estímulo englobador nos vacúolos autofágicos, sendo que sua destruição pode ser completa. O estímulo para a formação dos vacúolos autofágicos na miopatia distal não é conhecido, sendo que alguns autores acham que esta miopatia se produz devido a algum defeito enzimático lisossomal [ENGEL & BANKER, 1986b; FUKUHARA & COL, 1980; NONAKA & COL, 1981]

3. VACÚOLOS MARGINADOS

Os Vacúolos marginados são também de caráter autofágico, com forma irregular ou arredondada. Possuem uma margem de cor azul na hematoxilina e eosina e vermelha no tricromori de Gomori modificado por Engel e Cuninghan. Eles contêm estruturas membranosas multilamelares, acompanhada por grânulos de glicogênio, corpos densos, material amorfo, fibrilar e granular. O conteúdo do vacúolo nos cortes com criostato e microscopia óptica, devido ao artefato de corte, às vezes não permitem a sua visualização completa no citoplasma das fibras, porém o esboço permanece nas paredes. Suas bordas são coradas pelo "Sudan Black b" e tetróxido de osmium, e exibindo atividade na fosfatase ácida. Na microscopia eletrônica, na linha granular do vacúolo podem ser observadas enrodilhados de membranas [ENGEL & BANKER, 1986a; FUKUHARA & COL., 1980].

Um grande número de patologias neuromusculares apresentam vacúolos marginados como um dado histológico proeminente, que levou diversos autores a descreverem entidades com patogenia diferente, como na distrofia oculofaringéia, miosite por corpos de inclusão citoplasmática, músculos desinervados e miopatias distais [ENGEL & BANKER, 1986a; FUKUHARA & COL., 1980].

DESCRIÇÕES DE CASOS COM VACÚOLOS MARGINADOS E FILAMENTOS INTRANUCLEARES E CITOPLASMÁTICOS

Em 1965, Adams e Colaboradores, estudaram um paciente com dificuldades para correr desde a infância, que apresentava fraqueza proximal em membros superiores, sem história familiar, com paralisia de músculos tibiais anteriores e discreta ptose palpebral. As enzimas musculares eram normais e a eletromiografia mostrava um padrão miopático. A biópsia muscular mostrava uma miopatia com importante infiltrado inflamatório, sendo observados três tipos de corpos de inclusões. Um tipo era irregular e homogêneo, com massas eosinofílicas e bordos indefinidos, ocorrendo no citoplasma, isolados ou em associação com os outros tipos de inclusão. O segundo tipo era menor, com margens claras e arrodeadas por halo claro. O terceiro tipo, mais raro, estava localizado no núcleo sarcolemal e também era eosinofílico. As inclusões citoplasmática ocorriam em fibras com alterações degenerativas enquanto que as inclusões nucleares estavam em fibras melhor preservadas. Os três tipos podiam ser encontrados nas mesmas fibras e nem todas as fibras onde as inclusões se encontravam, estavam envolvidas por células inflamatórias. Culturas para vírus foram negativas e estudos bioquímicos dos componentes subcelulares não mostraram anormalidades. A conclusão dos autores, é que a regularidade na forma e tamanho das inclusões celulares sugeriam a origem numa única organela e não simplesmente a quebra dos produtos de degeneração do sarcoplasma [ADAMS & COL., 1965].

Em 1968, Chou descreveu um paciente com polimiosite crônica, cuja biópsia muscular mostrava uma miopatia inflamatória e o estudo pela microscopia eletrônica encontrou numerosos corpos membranosos, grânulos densos, agregados de estruturas filamentosas no citoplasma, nos núcleos sarcolemas e observaram três tipos de inclusões diferentes. O primeiro consistia de filamentos com ou sem cromatina rechassada para a periferia, às vezes agrupados longitudinalmente em feixes, tendo um comprimento maior que 1 micra. O segundo tipo consistia de múltiplos vacúolos, cercados por uma membrana, existindo filamentos microtubulares, dentro da mesma. O terceiro tipo, consistia de massas redondas e isoladas, cercadas por uma membrana dupla, contínua com a membrana nuclear e mostrando invaginação para o citoplasma. As inclusões citoplasmáticas com filamentos tubulares eram mais compactadas e separadas das miofibrilas.

Ocasionalmente, os filamentos estavam entre as miofibrilas e livres no citoplasma. Tanto os filamentos do núcleo como do citoplasma excediam a 1 micra de comprimento, com diâmetro de 100 a 230 Angstroms (Å), tendo um diâmetro interno de 60 a 74 Å. Esse autor acreditava que os filamentos provavelmente eram oriundos dos ribonucleotídeos helicoidais, que são comumente encontrados em culturas de células infectadas por mixovírus, que têm a habilidade de formar inclusões eosinofílicas em cultura de células. Tendo em vista essas comparações, o autor acreditava que este tipo de polimiosite era de etiologia viral e o mixovírus um dos possíveis agentes etiológicos [CHOU, 1968].

Em 1971, Yunis e Samaha aplicam o termo de miosite por corpos de inclusão citoplasmática (MCIC), para um caso de polimiosite crônica, com fraqueza muscular que iniciou nos membros inferiores, com hiporreflexia, atrofia muscular proximal e cuja biópsia muscular apresentava uma miopatia inflamatória crônica. A alteração marcante foi a presença de corpos eosinofílicos espalhados dentro das fibras musculares e inclusões nucleares pálidas. Os corpos citoplasmáticos ocorriam em fibras com degeneração e eram mais comuns nas fibras mais preservadas, formando vacúolos. Estes vacúolos eram arredondados, ovais ou irregulares, delineados por uma camada vermelha púrpura ou apresentavam uma capa concêntrica de material basofílico no tricromo de Gomori modificado. As inclusões intranucleares eram levemente fibrilares e eosinofílicas. Os núcleos eram maiores e as inclusões encontradas assemelhavam-se às da panencefalite esclerosante subaguda. Os filamentos nucleares mediam 150 Å e seu lúmen era de 30 Å. Os filamentos citoplasma mediam 170 Å e seu lúmen media 40 Å. A presença dos filamentos lembrava estruturas semelhantes aos paramixovírus, mas todas as culturas para vírus foram negativas [YUNIS & SAMAHA, 1971].

Em 1978, Carpenter e Colaboradores, descreveram seis casos que denominaram miosites por corpos de inclusão, sendo que todos os pacientes tinham dores musculares, astenia progressiva predominantemente distal, com hiporreflexia generalizada, sem história familiar. Em três casos, havia queixa subclínica de envolvimento de nervos periféricos, porém a investigação para neuropatia foi negativa. As enzimas musculares eram normais ou discretamente elevadas e a eletromiografia apresentava um padrão misto (neuromiopático). A biópsia de músculo apresentava aspectos de miopatia inflamatória com vacúolos marginados que continham grânulos basofílicos no seu interior. Algumas fibras continham um ou mais vacúolos de 2 a 15 micras de diâmetro, e às vezes apresentavam um delineamento basofílico na hematoxilina-eosina, coravam-se de marrom com tetróxido de ósmio e de azul com hematina ácida de Baker. Os vacúolos não apresentavam atividade na fosfatase ácida, porém os grânulos da parede no seu interior reagiam positivamente. A microscopia eletrônica revelou

massas de filamentos de 150 a 180 Å., usualmente vistos no citoplasma, cercados de membranas, próximos aos vacúolos e provavelmente correspondentes aos grânulos basofílicos vistos na histoquímica. Em secções transversais eles pareciam tubulares e apresentavam centro escuro. Três pacientes apresentavam filamentos no interior do núcleo e em quatro pacientes foram vistos corpos citoplasmáticos. Os filamentos descritos são achados mais no citoplasma que no núcleo, sendo possível que os formados no núcleo, sejam liberados para o citoplasma por quebra da membrana nuclear. Eles acreditavam que a MCIC é uma doença primariamente muscular, e as alterações encontradas na eletromiografia sugerindo um comprometimento neurogênico eram originados do dano primário da fibra muscular. Esses autores sugeriram que essas estruturas lembram nucleocapside viral de células infectados na leucoencefalite sub-aguda esclerosante [CARPENTER & COL 1978].

Eisen e Colaboradores, em 1983, descrevem 6 pacientes com idade entre 61 e 78 anos, um dos quais apresentava história familiar, com sintomas que iniciavam em média 5.4 anos antes, com atrofia e fraqueza muscular, sendo na metade dos casos, o início assimétrico, tendo, a maioria redução ou ausência de reflexos profundos. As enzimas musculares apresentavam-se discretamente aumentadas ou normais. A eletromiografia, em 50% dos casos mostrou padrão neurogênico e os demais padrão miopático. A velocidade de condução nervosa mostrou redução da amplitude dos potenciais em nervos peroneiros e tibiais posteriores na metade dos casos ($<0,5\text{mV}$). A amplitude da resposta do nervo peroneiro superficial foi baixa em 2 pacientes (2 microvolt). Todos os casos mostraram vacúolos na periferia da fibra; em três casos, a biópsia muscular revelou miopatia inflamatória e também foram observadas, nas biópsias, alterações neurogênicas, com fibras angulares atroficas, atrofia em grupos e alvos. Em todas as biópsias na microscopia eletrônica, foram observados enrodilhados de membranas osmiofilicas, inclusões filamentosas intranucleares e intracitoplasmáticas com 15 a 20 nm de diâmetro. Os autores concluem que MCIC é uma doença bimodal, com caracteres histológicos de miopatia e desinervação, sem ter envolvimento direto da unidade motora [EISEN & COL, 1983].

Ringel e Colaboradores, em 1987, relataram 19 casos com o diagnóstico de miosite de corpos de inclusão citoplasmática, com a idade média de 62,9 anos e sintomas que se iniciaram em média 5 anos antes. Apresentavam dores musculares e fraqueza progressiva simétrica, maior nas pernas, tanto proximal quanto distal. A maioria destes pacientes tinha fraqueza simétrica, com cinco pacientes tendo fraqueza assimétrica nas mãos ou pernas. Disfagia estava presente em alguns desses casos e foi menos proeminente que fraqueza facial. Nenhum tinha história familiar e não responderam a terapêutica com corticosteróide e terapia imunossupressiva. As enzimas séricas de origem muscular estavam moderadamente aumentadas em

15 pacientes. A eletromiografia revelou padrão miopático em oito dos 14 casos, sendo que os demais tinham alterações neurogênicas. As biópsias musculares evidenciaram uma miopatia inflamatória e foram encontrados diversos vacúolos marginados com centro claro e basofílico com parede granular nas fibras musculares. Na microscopia eletrônica existiam vacúolos autofágicos com enrodilhados de membranas, lisossomas e glicogênio, com filamentos que mediam 15-18 nm no seu diâmetro externo e 5 a 6 nm no diâmetro interno, ocasionalmente eram vistos no citoplasma e núcleo. A biópsia de nervo sural de quatro casos mostrou uma redução das fibras mielinizadas de todos os tamanhos. Os estudos de imunocitoquímica mostraram que a reação inflamatória e a lesão celular eram mediadas por linfócitos T, semelhante a que ocorre em polimiosites, mas diferente da que ocorre na dermatomiosite [RINGEL & COL., 1987].

Lotz e Colaboradores, em 1989, relatam 40 casos de MCIC, cuja idade média do início dos sintomas era de 56.1(28-71 anos). Somente 7 pacientes tinham menos de 50 anos e nenhum tinha história familiar. A grande maioria dos pacientes iniciaram com fraquezas em membros inferiores e um número pequeno em membros superiores ou nos quatro membros. Em dois terços dos casos a fraqueza foi proximal, e na metade dos casos era distal ou raramente difusa. Um terço dos casos apresentava queixas de disfagia. Os reflexos tendíneos estavam globalmente reduzidos ou ausentes em dois terços dos pacientes. Alguma forma de neuropatia periférica foi observada em 18% dos casos e a associação com doenças autoimunes foi relatada em 15% dos casos. A creatinoquinase esteve discreta ou moderadamente elevada em 80% dos casos. A velocidade de condução nervosa mostrou-se normal em todos os pacientes, exceto nos que tinham alguma forma de neuropatia associada. A maioria das eletromiografias sugeriam padrão misto. Em todos os casos, existiam um ou mais vacúolos por campo pequeno, e na maioria dos casos a biópsia era de miopatia inflamatória. Inclusões citoplasmáticas eosinofílicas foram observadas em 58% dos espécimens. Em 46% dos espécimens foi encontrada a combinação de inclusões eosinofílicas, com vacúolos marginados e na microscopia eletrônica, inclusões filamentosas em todos os pacientes. Em 39 casos, as inclusões estavam posicionadas próximo aos vacúolos, sendo que as inclusões intranucleares foram encontradas em um terço dos casos. O diâmetro dos filamentos intracitoplasmáticos e intranucleares variaram em 17-21 nm e 10-14 nm respectivamente. Estes autores tentaram diferenciar a MCIC das demais miopatias inflamatórias utilizando como critérios: início insidioso com dores e fraqueza muscular, níveis de creatinoquinase menores que 10 vezes o normal, refratariedade para o tratamento com altos níveis de prednisona, pelo menos a presença de um vacúolo por campo pequeno, pelo menos um grupo de fibras atroficas por campo pequeno, exudado inflamatório peri e endomesial e a microscopia eletrônica mostrando inclusões filamentosas típicas [LOTZ & COL., 1989].

ASSOCIAÇÃO DE CORPOS DE INCLUSÃO CITOPLASMÁTICA COM OUTRAS DOENÇAS

Com o decorrer dos anos, foram descritas diversas doenças onde foram encontrados corpos de inclusão citoplasmática similares aos encontrados nas descrições até aqui citadas, porém que não seguem os critérios diagnósticos anteriormente citados [ABARBANEL & COL., 1988; COLE & COL., 1988; COQUET & COL., 1990; FUKUHARA & COL., 1980; LANE & COL., 1985; GUTMANN & COL., 1985; MASSA & COL., 1991; MATSUBARA & TANABE, 1982.; NONAKA & COL., 1981; RIGGS & COL., 1984; SERRATRICE & COL., 1989; YOOD & SMITH, 1985].

Diversos autores relataram formas clínicas de atrofia com corpos de inclusão citoplasmática, sendo que apresentavam sinais de desinervação na eletromiografia. Na maioria das biópsias, a reação inflamatória estava ausente e a metade dos casos mostrou agrupamento na biópsia muscular [ABARBANEL & COL., 1988; SERRATRICE & COLS., 1989].

Foram descritas também formas típicas da doença de Kugelberg Welander com vacúolos marginados sendo que um deles demonstrava filamentos de 16-18 nm no citoplasma semelhantes aos descritos anteriormente [FUKUHARA & COL., 1980].

Nonaka e Colaboradores decreveram três casos de uma família com miopatia distal autossômica recessiva que iniciou na idade adulta, tendo fraqueza muscular distal lentamente progressiva, comprometendo principalmente músculos tibiais anteriores e, na biópsia muscular, era marcante a presença de vacúolos marginados, ausência de necrose e fagocitose. Um dos casos apresentava corpos de inclusão filamentosos no núcleo medindo de 15-20 nm [NONAKA & COL., 1981].

Foram também descritas outras miopatias distais com história familiar e que possuíam inclusões filamentosas. Dois casos foram descritos por Matsubara e Tanabe [MATSUBARA & TANABE, 1982], um caso descrito por Fukuhara e Colaboradores, cujo familiar apresentava distrofia oculofaríngea [FUKUHARA & COL., 1982], e um caso com filamentos nucleares, descrito por Mizusawa e Colaboradores [MIZUSAWA & COL., 1987].

Massa e Colaboradores descreveram dois casos com história familiar, que iniciaram na idade adulta com fraqueza muscular nas cinturas pélvica e escapular e cuja biópsia muscular revelava uma miopatia crônica ativa, com importante variação do diâmetro de fibras (hipertrofia e atrofia), tendo a presença de corpos de inclusão citoplasmática [MASSA & COL., 1991].

Coquet e Colaboradores relataram 10 casos de distrofia muscular oculofaringéia, que apresentavam além da clínica ocular, disfagia e a presença de vacúolos marginados, cuja biópsia dos músculos extraoculares, deltóide ou orofaríngeus apresentavam inclusões nucleares de 8.5 nm filamentosas citoplasmáticas com 16-18 nm de diâmetro [COQUET & COL., 1990].

Vários casos isolados, chamados de MCIC foram descritos associados a doenças imunologicamente mediadas como lupus eritematoso sistêmico (LES) [YOOD & SMITH, 1985], síndrome de Sjögren [GUTMANN & COL., 1985], outras doenças do colágeno [LANE & COL., 1985] e trombocitopenia crônica autoimune [RIGGS & COL., 1984], leucoencefalopatia periventricular com miopatia familiar com alterações musculares que lembravam miosite por corpos de inclusão [COLE & COL., 1988].

Tendo em vista a grande variedade de doenças descritas que apresentam vacúolos marginados e corpos de inclusão citoplasmática, com patogenia, aspectos clínicos e hereditariedade diferente, é possível que talvez estejamos observando uma alteração histológica, comum a diversos fatores patogênicos.

Como foi exposto acima, tivemos diversas dúvidas quanto à classificação clínica dos pacientes com corpos de inclusão citoplasmática na biópsia muscular. Por isso, nos propomos a efetuar o presente estudo.

Dada a variedade de apresentações clínicas, laboratorial e histológica dos casos que apresentavam vacúolos marginados na biópsia muscular, detectados no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, resolvemos estudá-los.

OBJETIVOS

1. Estudar as estruturas descritas como "corpos de inclusão citoplasmática" nas biópsias musculares processadas a fresco e procurar correlacionar com os dados clínicos e laboratoriais.
2. Verificar se os "corpos de inclusão citoplasmática" têm especificidade para determinada doença ou se ocorrem em entidades diferentes.
3. Tentar relacionar os "corpos de inclusão citoplasmática" com determinado fator patogênico.

MATERIAL E MÉTODOS

1. CASUÍSTICA

Foram detectados 16 casos entre 1400 biópsias existentes no banco de dados do Laboratório Histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, realizadas no período de 1976 a 1990, cuja presença de vacúolos na histologia sugeria corpos de inclusão citoplasmática.

A idade variou entre 7 e 69 anos, com idade média de $36,0 \pm 19,9$ anos, sendo que doze eram do sexo masculino e quatro do sexo feminino. O início da doença variou entre 2 e 59 anos, ocorrendo em média aos $20,5 \pm 19,5$ anos e o tempo de doença entre 2 e 45 anos, com média de $5,5 \pm 11,7$ anos (tabela 1).

Tabela 1
CASUÍSTICA

CASO	IDADE (anos)	SEXO	INÍCIO DA DOENÇA (anos)	TEMPO DE DOENÇA (anos)
1	28	M	26	2
2	53	M	43	10
3	62	M	56	6
4	71	F	59	12
5	7	M	5	2
6	14	F	4	10
7	16	M	14	2,5
8	20	M	18	2
9	31	M	28	3
10	69	F	64	5
11	20	M	15	5
12	25	M	23	2
13	47	M	2	45
14	44	M	15	29
15	29	F	13	16
16	41	M	27	14

F= feminino. M=masculino

A maioria dos pacientes foram avaliados no ambulatório de Doenças Neuromusculares da Especialidade de Neurologia do Departamento de Clínica Médica e a seguir admitidos. Na admissão, além da rotina normal da avaliação médico-neurológica, foram submetidos a um protocolo rotineiro do serviço com ênfase às queixas de dores musculares, câimbras, diplopia, disfagia, disfonia. O protocolo consta da identificação, seguido por exame neurológico minucioso envolvendo principalmente queixas específicas da doença, teste da força muscular nos diversos grupos musculares proximais e distais de membros superiores e inferiores, avaliando-se os músculos isoladamente pela escala do Medical Research Council [MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1976]. Também foram registradas atrofia e hipertrofias musculares, lordose, cifose, escoliose, contraturas musculares, deformidades nas articulações, miotonia e ptose palpebral.

A seguir descrevemos sucintamente os casos estudados, relatando somente os dados positivos e negativos de importância.

CASO 1: P.A.S, 28 anos, sexo masculino, cor branca.

Início há 2 anos com dor lombar baixa à direita, sem irradiação de instalação gradativa, que foi progressivamente se intensificando, de forma contínua, piorando com a deambulação, tendo melhora com analgésicos, repouso e antiinflamatórios não hormonais. Há 1,5 ano notou diminuição gradativa da força muscular no terço distal de membro inferior esquerdo, e redução da força distal em membros superiores. Há 11 meses dificuldade para deambular, não conseguindo sustentar os pés contra a gravidade. Há 6 meses pés caídos, na marcha.

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia de músculos interósseos das mãos e das panturrilhas, maior à esquerda. Hipotonia em músculos de membros inferiores. Força muscular: deltóide, rombóide, iliopsoas 4+/4+ (direito/esquerdo); abdutor curto polegar, abdutor do quinto dígito e oponente do polegar 4-/4-; quadríceps, e bíceps femoral 4+/4+; tibial anterior, gastrocnêmio, extensores, abdutores e flexores dos pododátilos 3/3. Demais músculos grau 5/5. Coordenação normal. Ausência de reflexos profundos tricipitais, estilorradiais. Reflexos bicipitais, patelares e aquilianos +/- (direito/esquerdo). Reflexos cutâneo-abdominais ++/++ e cutâneo-plantar em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: escarvante.

Evolução: iniciada prednisona 80 mg ao dia, com melhora subjetiva. Um ano após quadro estável, usando prednisona 20 mg em dias alternados. No ano seguinte quadro estável e retirado a prednisona. Seis meses após por evoluir com atrofia muscular distal importante, foi iniciado com azatioprina 150 mg/dia, porém sem melhora efetiva, um ano após.

CASO 2: I.P.S, 53 anos, sexo masculino, cor branca.

Há 10 anos, iniciou com dores nas panturrilhas. Há 3 anos, teve redução da força e atrofia muscular generalizada. Há 2 anos, com dificuldade para deambular e quedas frequentes.

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia muscular generalizada mais intensa em braços e coxas. Força muscular: bíceps, tríceps e deltóide 3+/3+; extensores e flexores dos dedos 4-/4-; iliopsoas, quadríceps, bíceps femoral 3+/3+; tibial anterior, e gastrocnêmio 4-/4-, demais 5/5. Arreflexia profunda generalizada. Reflexo cutâneo-abdominal 2+/2+. Reflexo cutâneo-plantar em flexão bilateral. Coordenação normal. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: anserina.

CASO 3: H.K. 62 anos, sexo masculino.

Iniciou há 6 anos, com redução da força dos músculos de membros inferiores, sendo que há 2 anos, há piora progressiva da força. Há 3 meses, com dificuldade para deambular e redução da força em membros superiores de predomínio proximal.

História mórbida pregressa: caxumba aos 50 anos.

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia de músculos de coxa e pernas. Hipotonia generalizada. Força muscular: deltóide e bíceps 4+/4+, quadríceps e iliopsoas 4-/4- tibial anterior e gastrocnêmio 3+/3+; demais músculos grau 5. Coordenação normal. Reflexos bicipital, tricipital e estilorrádial +/+, ausência de reflexos profundos em membros inferiores. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha anserina.

Evolução: dificuldade progressiva para deambular e 2 anos após investigação deixou de subir escadas e deambulava somente com apoio. Fez uso de prednisona sem melhora dos sintomas. Dois anos após, iniciou disfagia e óbito em maio/93 por broncoaspiração.

CASO 4: M.D.C.C.O, 71 anos, sexo feminino, cor branca..

Há 12 anos, iniciou com disfagia e dificuldade, para subir escadas necessitando de apoio do corrimão. Também notou desequilíbrio com progressão gradativa e piora progressiva nos últimos 2 anos. Há 1 ano, dificuldade na coordenação das mãos, com redução da força.

Ausência de história familiar.

Exame neurológico: força muscular do deltóide, supraespinhosos, bíceps, tríceps, interosseos mãos e oponente do polegar 4+/4+, iliopsoas, gastrocnêmio, tibial anterior 4-/4- demais músculos 5/5. Tônus normal. Coordenação normal.

Reflexos profundos: bicipitais, tricipitais, estilorradaiais, patelares e aquilianos +/+. Reflexos cutâneo-abdominal ++ e cutâneo-plantar em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normais. Marcha: anserina.

Evolução: Iniciado prednisona 60 mg ao dia e após 1 mês em dias alternados. Acha que melhorou para andar principalmente no equilíbrio, embora continue com dificuldade para subir escadas. Ao exame de força muscular: deltóide, bíceps e tríceps grau 5 bilaterais, mãos, iliopsoas e tibial anterior 4+/4+; quadríceps, extensores e flexores dos dedos da mão 4-/4-. Reflexos profundos nos membros inferiores ++/++, arreflexia patelar e aquiliana bilateral. Reduzida a prednisona para 40 mg/dias alternados. Um mês após, subjetivamente relatou melhora da força muscular, conseguindo subir escadas, com mais equilíbrio e melhorando a deglutição, mas, objetivamente, a força muscular estava idêntica. Quatro meses após, força muscular estava igual nos membros superiores, embora tenha melhorado para costurar, subindo escadas com mais facilidade. Três anos após, discreta redução da força distalmente. Em uso de prednisona 20 mg em dias alternados. Atualmente, sem prednisona, deambulando com dificuldade e com insuficiência cardíaca.

CASO 5: L.J.S., 7 anos, sexo masculino e cor branca.

Desde os 5 anos de idade, apresentando quedas frequentes, dificuldade para subir escadas, pular, sentar e levantar de cadeiras. Atualmente só sobe escadas com auxílio.

Avô paterno andou somente com 7 anos de idade e mais tarde ficou totalmente normal.

Exame neurológico: fácies miopática sem lagofthalmia, atrofia de músculos proximais e distais dos membros superiores e inferiores, porém com predomínio de músculos da cinturas pélvica e escapular. Lordose lombar e presença de retração tendíneas de aquilianos. Força muscular: deltóide, bíceps, oponente do polegar e interósseos 4-/4-, quadríceps 4-/4-, iliopsoas, tibial anterior e gastrocnêmio 3+/3+; demais, grau 5. Hipotonia generalizada com predomínio em membros inferiores. Manobra de Gowers presente. Reflexos profundos: bicipitais, tricipitais, estilorradaiais, patelares e aquilianos +/+. Reflexo cutâneo-abdominal +/- bilateralmente. Reflexo cutâneo-plantar em flexão. Marcha: anserina.

Evolução: iniciou com prednisona 20 mg ao dia e 3 meses após foi observada melhora na deambulação, subindo e descendo escadas melhor, mas ainda necessitando de auxílio. Seis meses após, em uso de prednisona, subindo e descendo escadas sem apoio. Força muscular do deltóide, bíceps e iliopsoas 4-bilateralmente; mãos, tibial anterior e gastrocnêmio 4+/4+. Manobra de Gowers ainda presente.

CASO 6: J.R, 14 anos, sexo feminino, cor branca.

Aos 3 anos de idade, a família notou que tinha quedas freqüentes, tropeçava muito, nunca correu ou pulou direito. Sempre teve dificuldades para deambular, subir e descer escadas. Com o passar dos anos, a fraqueza muscular progrediu. Atualmente tem dificuldade para subir escadas, não corre e não pula. Nega disfagia e diplopia. Relata também aumento de panturrilhas com dor ao deambular.

Um irmão com 9 anos e sintomas semelhantes. Pais consangüíneos.

Exame neurológico: lordose discreta. Discreta ptose palpebral bilateral. Hipertrofia de panturrilhas. Força muscular: músculos de membros superiores 5/5; quadríceps 4+/4-; iliopsoas, tibial anterior e bíceps sural 4-/4-; demais músculos grau 5/5. Discreta hipotonia em membros inferiores. Coordenação: normal. Reflexos profundos: bicipitais, tricipitais, estilorradiais e patelares +/-; aquileus ausente bilateralmente. Reflexos cutâneo-abdominais ++ e cutâneo-plantares em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: anserina.

CASO 7: S.C.A, 16 anos, sexo masculino e cor branca.

Desde a infância, com dificuldade para deambular. Há 2 anos, iniciou com piora da força, percebendo redução da massa muscular proximal nos membros inferiores, principalmente em coxas, com dificuldade para subir escadas, levantar após sentar e agachado.

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia de coxas. Força muscular: membros superiores 5/5; gastrocnêmio e bíceps femoral grau 4+/4; quadríceps 4-/4+; tibial anterior 3-/3+, pés caídos bilateralmente. Hipotonia de músculos em membros inferiores. Coordenação: normal. Reflexos profundos: bicipitais, tricipitais e estilorradiais ++/++; aquiliano ++; patelares ausentes. Reflexo cutâneo-abdominal ++/++ e cutâneo-plantar em flexão bilateralmente. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: paraparética, não conseguindo andar nos calcanhares.

CASO 8: J.C.C., 20 anos, sexo masculino, cor branca.

Desde a infância, tem pouco desempenho para esportes, porém somente há 2 anos iniciou com atrofia distal de membros inferiores com caráter progressivo. Dificuldade para deambular e para subir ou descer escadas. Há 1 ano incapacidade para dorsoflexão de ambos os pés.

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia de quadríceps, tibial anterior e gastrocnêmio bilateral porém maior à direita. Força muscular: Grau 5/5 em membros superiores; quadríceps, iliopsoas, gastrocnêmio grau 4+/4+; tibial anterior 2/3; demais músculos 5/5. Coordenação normal. Hipotonia distal em membros inferiores. Reflexos profundos: bicipitais, estilorradiais, e patelares ++/++, tricipitais e

aquilianos +/+. Reflexo cutâneo-abdominal ++/++ e cutâneo-plantar em flexão bilateralmente. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: escarvante.

CASO 9: R.R.B, 31 anos, do sexo masculino, cor branca.

Há 3 anos, redução progressiva da força em membros inferiores, de predomínio distal, com dificuldade para correr. Há 1 ano, dificuldade para sair de cadeiras sem auxílio. Há 7 meses, redução da força em membros superiores, com dificuldade em mantê-los elevados. Apresenta quedas freqüentes, dificuldade para andar, subir e descer escadas.

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia importante de músculos supra e infraescapulares, sendo discreta de interósseos e quadriceps. Força muscular: rombóide, supraespinhoso e deltóide 4-/4-, tríceps e bíceps 4+/4+; quadriceps 4-/4; iliopsoas 3/3; tibiais anteriores e gastrocnêmios 4+/4+. Demais músculos 5/5. Hipotonia generalizada. Coordenação: normal. Reflexos profundos: bicipitais, tricipitais, estilorrádial e patelares +/+. Aquileu ausente bilateralmente. Reflexo cutâneo-abdominais 2+/2+ e cutâneo-plantar em flexão bilateralmente. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: anserina.

CASO 10: F.C., 69 anos, sexo feminino, cor branca.

Há 5 anos, evoluiu com dores abaixo dos joelhos que surgiam ao deambular. Há 3 anos dificuldade para subir escada e tropeçando com facilidade. Há 2 anos dificuldade para levantar objetos com o membro superior direito. Disfagia ocasional.

Dois irmãos com problema para andar e subir escadas.

Exame neurológico: voz anasalada. Atrofia discreta em bíceps direito, discreta hipertrofia de panturrilhas. Força muscular: bíceps, tríceps e extensores do carpo 4+/4+ e demais músculos de membros superiores 5/5; iliopsoas 3+/3+ e demais músculos em membros inferiores 4+/4+. Hipotonia de membros inferiores. Coordenação normal. Reflexos profundos: Bicipitais, tricipitais e estilorrádiais +/++; arreflexia de patelares e aquilianos. Reflexo cutâneo-abdominal ++/++ e plantares em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: anserina.

Evolução: usou prednisona por 6 meses sem melhora na força muscular e reflexos.

CASO 11: A.B. 20 anos, sexo masculino, branco.

Há 5 anos, iniciou com fraqueza no pé esquerdo, com dificuldades para calçar chinelos e há 4 anos, com os mesmos sintomas no pé direito. Há 3 anos, fraqueza em membros superiores e redução da massa muscular em membros inferiores. Atualmente, com dificuldade para deambular, subir e descer escadas.

Um irmão com problema semelhante.

Exame neurológico: atrofia escapular moderada em membros superiores. Força muscular: bíceps, deltóide, supraescapular e tríceps 4+/4+; iliopsoas, quadríceps, bíceps femoral 4-/4-; tibial anterior 3-/3+; gastrocnêmio 3+/3+; extensores e flexores dos dígitos 3-/3-. Demais músculos 5/5. Hipotonia generalizada com predomínio membros inferiores. Coordenação: normal. Reflexos profundos: Ausência dos bicipitais, patelares e aquilianos bilateralmente; tricipitais e estilorradiais +/+. Reflexos cutâneo-abdominais normais e reflexo cutâneo-plantar em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: escarvante.

CASO 12: A.B. 25 anos, sexo masculino, cor branca.

Há 3 anos, diminuição da força em membros inferiores e há 2 anos após redução da força em membros superiores, diminuição importante da massa muscular nos 4 membros. Há 12 meses sentiu piora importante da força muscular, e desde então só deambula com apoio.

Um irmão com doença semelhante.

Exame neurológico: atrofia muscular generalizada e lordose acentuada. Força muscular: rombóide, deltóide 4-/4-; bíceps, tríceps, flexores e extensores do punho 3-/3-; oponente do polegar e interósseos 2/2; iliopsoas, quadríceps e gastrocnêmio 3-/3-; tibial anterior 2/2; demais músculos 5/5. Hipotonia discreta generalizada. Coordenação: normal. Reflexos profundos: bicipitais, tricipitais, patelares +/+, ausência dos reflexos estilorradial e aquilianos. Reflexo cutâneo-abdominal +/+ e cutâneo-plantar em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: anserina porém, deambula somente com apoio.

CASO 13: A.X.S., 47 anos, sexo masculino, cor branca.

Desde a infância, com dificuldade para correr, praticar esportes, e sentia as pernas fracas. A dificuldade nos membros inferiores foi se acentuando e, há 5 anos, deambula somente com apoio. Neste período, também apresentou falta de força em membros superiores com perda da massa muscular. Atualmente só sobe escadas com auxílio.

Três irmãos com problema semelhante.

Exame neurológico: atrofia dos músculos proximais em membros superiores e membros inferiores. Hipertrofia de músculos cervicais e panturrilhas.

Força muscular: bíceps, tríceps, deltóide, supraespinhoso, oponente de polegar e interósseos 3+/3+; quadríceps, iliopsoas, tibial anterior 3+/3+, adutores da coxa e gastrocnêmio 4-/4-. Demais músculos 5/5. Hipotonia generalizada. Coordenação: normal. Ausência de reflexos profundos bicipitais, tricipitais, patelares e aquilianos, com estilorrádial +/+. Reflexos cutâneo-abdominais ++ e cutâneo-plantar em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: anserina.

CASO 14: P.P.B.M. 44 anos, sexo masculino, cor branca.

Iniciou, aos 15 anos de idade, com dificuldade na marcha e para subir escadas somente aos 32 anos. Fraqueza em membros superiores há 15 anos, com piora progressiva dos sintomas, e há 20 anos, não consegue trabalhar. Há 6 anos, não consegue dirigir automóvel..

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia de cinturas escapular e pélvica, com hipertrofia de panturrilhas. A força muscular: bíceps, deltóide, tríceps, oponente do polegar, quadríceps grau 4-/4-; iliopsoas 4-/3, tibial anterior 3/2; demais músculos força 5/5. Hipotonia generalizada. Coordenação: normal. Reflexos profundos: Bicipitais, tricipitais, estilorradiais e aquilianos ++, patelares ausentes bilateralmente. Reflexos cutâneo abdominais ++ e cutâneo plantar em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normal. Manobra de Gowers presente. Marcha: escarvante.

CASO 15: M.S.P., 29 anos, sexo feminino, cor branca.

Aos 16 anos, câimbras em membros inferiores. A seguir, notou diminuição de força muscular em membros superiores e inferiores, com redução da massa muscular em cintura escapular. Há 10 anos, não consegue elevar os membros superiores acima da cabeça, subir ou descer escadas. Há 6 anos, não levanta de cadeiras, sem apoio. Há 1 mês não fica em pé e não deambula. Sensação parastésica, que iniciou em membros inferiores. Atualmente, tem dificuldade para elevar a cabeça do travesseiro.

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia muscular generalizada de predomínio proximal. Força muscular: músculos cervicais 3, rombóide grau 3/3, bíceps 4-/4+; tríceps 4+/4; iliopsoas, quadríceps e tibial anterior grau 2/3; adutores da coxa 0/0. Demais músculos, grau 5. Hipotonia generalizada Coordenação: normal. Reflexos profundos: ausência de bicipitais, estilorradiais e patelares bilateralmente; tricipitais ++ e aquiliano ++/++. Reflexos cutâneos-abdominais ++/++ e cutâneo-plantar em flexão bilateral. Sensibilidade profunda e superficial normal. Marcha: não deambula.

CASO 16: A.L. 41 anos, sexo masculino, cor branca.

Há 14 anos, iniciou com parestesias nos pés, que surgiam após ficar muito tempo sentado e diminuía com o movimento. Evoluiu com hipoestesia, tendo a sensação de não ter os pés. Há 10 anos, dificuldade para movimentar o pé esquerdo e para andar com sapatos. Passou a usar somente "chinelo de dedo". Há 5 anos, dificuldade para elevar os pés e pododáctilos. Nos últimos meses notou redução da força muscular nas pernas.

Nega história familiar.

Exame neurológico: atrofia de músculos tibiais, gastrocnêmios e interósseos dos pés. Força muscular: iliopsoas, quadríceps e bíceps sural 4+/4+; tibiais anteriores, extensor longo do hálux e flexores dos dedos 2/2; demais 5/5. Hipotonia nos quatro membros. Coordenação: normal. Reflexos profundos: bicipitais, tricipitais e estilorradaiais +/+, patelares e aquileus ausentes. Reflexos cutâneo-abdominais +/+ e cutâneo-plantar em flexão bilateral. Hipoestesia para dor no terço distal de ambas as pernas. Sensibilidade tátil, reduzida distalmente em mãos e pés. Senso de vibração reduzida em membros inferiores distalmente. Senso de posição segmentar normal. Marcha: escarvante.

2. INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL

Em todos os casos, foram realizados hemograma, velocidade de hemossedimentação, glicemia, uréia, creatinina, cálcio, fósforo, fosfatase alcalina, potássio, sódio, triiodotironina, tetraiodotironina, mucoproteínas. Dependendo dos dados clínicos e conforme a suspeita levantada, a investigação foi estendida com eletrocardiograma, eletroencefalograma, raios X, teste de tensilon e líquido céfalo-raquidiano.

Também foram dosadas as enzimas creatinaquinase (CK), desidrogenase láctica (LDH), aldolase, transaminase glutâmica oxaloacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP). Os resultados serão relacionadas em número de vezes o valor normal aumentado, devido aos diferentes métodos utilizados.

O líquido céfalo-raquidiano foi examinado através de punção lombar em oito casos que apresentavam dados sugestivos de neuropatia ou doença do neurônio motor. Foi colhido com medidas das pressões inicial e final, sendo feita a análise citológica, bioquímica e sorológica.

3.ELETRONEUROMIOGRAFIA

Dos 16 pacientes selecionados, somente um não foi submetido à eletromiografia e estudo da condução nervosa motora e sensitiva. As técnicas utilizadas foram as usadas rotineiramente no Laboratório de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da UFPr [BROWN & GILLIAT, 1984; KIMURA 1989; SETHI & THOMPSON, 1989; WERNECK, 1985].

Foram realizados os estudos de velocidade de condução nervosa com medidas de latências proximais e distais em milissegundos, amplitude dos potenciais evocados em milivolt (mV) e cálculo da velocidade de condução nervosa em metros por segundo (ms) [KIMURA, 1989]. A velocidade foi obtida pelo cálculo entre a diferença das duas latências (milissegundos) divididas pela distância em centímetros (cm) [KIMURA, 1989].

As conduções nervosas foram realizadas em pelo menos dois nervos motores e um sensitivo. Dependendo do caso um número maior de nervos foi avaliado.

As eletromiografias foram realizadas em pelo menos 2 músculos. Foram avaliadas a atividade em repouso e atividade voluntária. No repouso foi observada a atividade de inserção, presença de fibrilações, ondas positivas, fasciculações, descargas repetitivas complexas, descargas miotônicas. Nos esforços, foram avaliadas as características da unidade motora e duração média para a idade, amplitudes médias, presença de polifásicos, recrutamento e padrão aos esforços [BUCHTHAL, 1957; KIMURA, 1989; WERNECK, 1985].

A associação dos potenciais encontrados em cada eletromiografia, permitiu fazer um diagnóstico eletromiográfico. Para tal, foram consideradas padrão MIOPÁTICO as que apresentavam potenciais voluntários de duração e voltagens médias reduzidas para a idade, excesso de polifásicos curtos e recrutamento aumentado. Foram consideradas padrão de DESINERVAÇÃO, as que apresentavam duração e voltagem média aumentada para a idade, recrutamento reduzido com ou sem a presença de atividade espontânea (fibrilações, ondas positivas e fasciculações), excesso de polifásicos longos, recrutamento reduzido e potenciais gigantes. Foram consideradas padrão MISTO OU NEUROMIOPÁTICO, quando coexistiam dados de eletromiografia miopática e neuropática nos músculo do paciente estudado [BUCHTHAL, 1957; KIMURA, 1989; WERNECK, 1985].

Quando os critérios acima não foram preenchidos porém a eletromiografia era anormal, esta foi considerada limitrofe, para miopatia ou para desinervação.

4. BIÓPSIA MUSCULAR

Todos os pacientes foram submetidos à biópsia muscular, processada por técnicas de congelação, histoquímica, imunocitoquímica e microscopia eletrônica. Como estas técnicas são fundamentais no presente estudo, as descrevemos abaixo com detalhes.

A biópsia muscular foi realizada em um músculo geralmente com grau 4 no exame clínico [MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 1976]. Nos casos em que a doença estava num estágio muito avançado foi escolhido o músculo de melhor acesso e menos afetado. Foram escolhidos os músculos contralaterais à eletromiografia e que não tivessem sido submetidos previamente à mesma. Caso a eletromiografia tivesse sido realizada, a biópsia seria feita somente duas semanas após, afim de evitar a resposta muscular produzida pela agulha (miopatia da agulha) [ENGEL, 1967].

TÉCNICA DA BIÓPSIA MUSCULAR

A biópsia muscular foi realizada conforme a técnica em uso no Serviço de Doenças Neuromusculares, constando dos seguintes pontos:

- 1-Tricotomia da região.
- 2-Antissepsia da pele com pólvidine degermante, depois éter e álcool iodado.
- 3-Anestesia local com xylocaína a 1% (crianças) e a 2% (adultos), sem vasoconstritor. Anestesia apenas da pele e tecido celular subcutâneo sem infiltrar o músculo.
- 4-Incisão da pele e do tecido celular subcutâneo, afastando a fáscia muscular.
- 5-Retirada de fragmento de músculo, medindo aproximadamente 1,0 cm x 0,5 cm x 0,5 cm.
- 6-O fragmento de músculo era embebido em gaze com soro fisiológico logo após a retirada e transportado ao laboratório.
- 7-Hemostasia do músculo.
- 8-Fechamento da fáscia com fio catgut e sutura da pele com fio de algodão.
- 9-Curativo compressivo.

TÉCNICA DE CORTE E PREPARAÇÃO

O fragmento de músculo era montado no laboratório de histoquímica, com o cuidado de desprezar a porção de músculo pinçada durante a retirada do fragmento em suporte especial com adraganth 7%, recoberto com talco em pó e a seguir congelado e armazenado em nitrogênio líquido a -170°C. Posteriormente, os fragmentos de músculos eram cortados em criostato a -20°C, com espessura de 8 micra para histoquímica e 4 micra para as técnicas de imunocitoquímica, sendo colhidos em lamínulas de 22 x 22 mm.

O restante dos blocos foi posteriormente fragmentado em peças de 2 x 3 mm e utilizado para a preparação das secções para microscopia eletrônica [ASKANAS & ALVAREZ, 1992; DUBOWITZ, 1985]

A - HISTOQUÍMICA E CORTES A FRESCO

TÉCNICAS:

Os fragmentos musculares foram estudados por colorações a fresco, utilizando os métodos de hematoxilina-eosina, PAS, tricromo de Gomori modificado por Engel e Cunningham, "oil red O", cresil violeta e "sirius red". Ao mesmo tempo foram realizadas as técnicas de histoquímica para a NADH-Tetrazolium reductase, ATPases com pH 9.4, 4.3, 4.6, miofosforilase, esterase inespecífica, fosfatase alcalina e ácida, desidrogenase succínica, citocromo-c-oxidase e adenilato deaminase. Todas as colorações e reações histoquímicas são realizadas rotineiramente no laboratório de Histoquímica do Serviço de Doenças Neuromusculares [DUBOWITZ, 1985, pg.3-40; WERNECK, 1981; WERNECK, 1991]. Alguns dos casos não foram submetidos a coloração do "sirius red" e citocromo-c-oxidase, pois na ocasião da investigação dos casos, as mesmas não eram realizadas.

PRINCIPAIS ALTERAÇÕES DETECTADAS CONFORME A TÉCNICA

A finalidade da realização de cada uma dessas técnicas, é demonstrar e avaliar alguns aspectos anatomopatológicos específicos, sendo que os principais descrevemos abaixo [CULLEN & COL., 1992,; DUBOWITZ, 1985, pg.82-128; ENGEL & BANKER, 1986a, WERNECK, 1981; WERNECK, 1991].

TÉCNICAS DE CONGELACÃO

1. **Hematoxilina-eosina e tricromo de Gomori modificado:** tecido conjuntivo endomisial, infiltração por tecido adiposo, vasos, nervos, diâmetro e variação dos mesmos nas fibras, distribuição das fibras dentro dos fascículos, núcleos e alterações nucleares, necrose, fagocitose, reação inflamatória e alterações estruturais (segmentações, fibras granulares, agregados tubulares, corpos nemalínicos, massas sarcoplasmáticas, vacúolos, corpos de inclusão citoplasmáticos, fibras basofílicas, fibras hipercontráteis).
2. **PAS:** Excesso ou falta de glicogênio nas fibras musculares.
3. **"Oil red "O":** deposição de lipídios nas fibras e dentro de vacúolos.
4. **Cresil violeta:** presença de metacromasia em nervos e músculos (geralmente material de depósito).
5. **Sirius red:** Tecido conjuntivo e colagênio pela afinidade com as ligações sulfatídeas.

TÉCNICAS DE HISTOQUÍMICA

Nas reações enzimáticas analisadas pela histoquímica é possível identificar as alterações estruturais que ocorrem nas fibras, sendo as principais descritas abaixo:

1. **NADH-Tetrazolium redutase:** identifica o retículo sarcoplasmático e mitocôndrias, sendo que suas alterações formam os cores centrais, sacabocados, turbilhões, fibras em anéis, fibras angulares escuras atroficas e alvos.
2. **ATPases pH 9.4, 4.3 e 4.6:** os diversos tipos de fibras são identificados por estas reações, sendo possível fazer análise da variação do diâmetro, predomínio, deficiência, atrofia, hipertrofia e agrupamentos de tipos diferentes de fibras.
3. **Esterase inespecífica:** identifica principalmente as fibras que estão em processo de desinervação, caracterizado por fibras anguladas atroficas. Identifica também as placas motoras e células mononucleares (macrófagos) dispersas no interstício.
4. **Fosfatase ácida:** reação enzimática específica para lisosomas ativados, sendo caracterizada por aumento focal nas fibras, fibras positivas, aumento no interstício em células mononucleares, aumento em fagócitos nas áreas de necrose e nos nervos.
5. **Fosfatase alcalina:** permite identificar também enzimas lisosomais e de reação crônica, caracterizando-se histologicamente como fibras positivas, aumento no interstício e nos nervos periféricos.
6. **Desidrogenase succínica:** enzima encontrada somente em mitocôndrias, permitindo identificar o acúmulo, distribuição e volume das mesmas.
7. **Citocromo-c-oxidase:** idêntico a desidrogenase succínica, mas permite identificar deficiência específica da enzima.

8. Miofosforilase: identifica a enzima nas fibras, servindo como contra-prova da diferenciação das ATPases e permite identificar sua deficiência na histologia.

DIAGNÓSTICOS ANATOMOPATOLÓGICOS [WERNECK, 1981; WERNECK, 1985; WERNECK, 1991]

A avaliação conjunta dos diversos elementos acima, nos permitirá formular um diagnóstico, conforme a sua frequência ou a sua ausência. Os dados acima poderão ser agrupados nos seguintes diagnósticos anatomopatológicos:

1. MIOPATIA CRÔNICA, quando existe proliferação do tecido conjuntivo, infiltração por tecido adiposo, núcleos internos, divisões, turbilhões, sacabocados, enrodilhados, anéis, fibras positivas na fosfatase alcalina, aumento da fosfatase alcalina no interstício, atrofia de fibras do tipo 1 e hipertrofia de fibras do tipo 2.

2. MIOPATIA CRÔNICA E ATIVA quando além das alterações da miopatia crônica, tivermos reação inflamatória, necrose, fagocitose, fibras basofílicas, fosfatase ácida aumentada nas fibras e no interstício.

3. MIOPATIA INFLAMATÓRIA na presença de necrose, fagocitose, núcleos internos, fibras basofílicas, fosfatase ácida aumentada nas fibras e no interstício, infiltrado inflamatório intersticial difuso e excessivo em relação ao número de fibras necróticas ou perivascular e atrofia perifascicular.

4. DESINERVAÇÃO RECENTE podemos encontrar raras fibras com necrose, fibras angulares escuras atróficas na esterase inespecífica e no NADH-tetrazólium redutase, atrofia de fibras do tipo 2.

5. DESINERVAÇÃO CRÔNICA, além dos elementos da desinervação recente encontramos alvos, agrupamentos, ausência de necrose ou fagocitose, hipertrofia de fibras tipo 1 ou 2, formando grandes grupos.

6. MISTAS, quando combinam elementos para miopatia e desinervação, podendo ter o predomínio de um ou outro tipo de alteração.

As miopatias crônicas e ativas são geralmente encontradas nas distrofias musculares (Duchenne, Becker, cinturas pélvica e escapular, fâscio-escapulo-humeral e outras). As desinervações crônicas e recentes são encontradas geralmente nas polineuropatias e doenças do neurônio motor inferior (atrofias musculares espinhais e esclerose lateral amiotrófica). As miopatias inflamatórias são encontradas nas dermato-polimiosites e vasculites.

B - IMUNOCITOQUÍMICA

Os fragmentos musculares após a realização da histoquímica foram congelados e armazenados em nitrogênio líquido a -170 C, e posteriormente cortados em criostato a -25 C, com espessura de 4 micra. Os cortes foram colhidos

em lâminulas de 22x22 mm previamente preparadas com D-L-polilisina e, em seguida foram fixados e tratados com os antisoros correspondentes, afim de identificar os tipos de linfócitos T (CD11+), linfócito supressor citotóxico (CD8+), linfócito T auxiliar (CD4+); linfócito B; macrófago, complemento C3; imunoglobulinas A (IgA), G (IgG), e M (IgM) e células exterminadores naturais (NK) e analisados através de imunofluorescência [ARAHATA & ENGEL, 1984; ARAHATA & ENGEL, 1988b; ENGEL & ARAHATA, 1984; GIORNO & COL., 1984; ISENBERG, 1983].

B. - 1 AVALIAÇÃO EM TECIDO DAS SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS, CÉLULAS B, MACRÓFAGOS E EXTERMINADORES NATURAIS.

As secções de músculo com 4 micras foram fixadas com acetona gelada por 20 min. A seguir, ficaram expostas ao ar ambiente por 5 minutos para secar e depois foram lavadas com tampão salino fosfato pH 7,4 (PBS), por cinco minutos, duas vezes. Em seguida foram tratadas por 30 minutos com PBS, contendo 2% de albumina bovina, 10% de soro AB inativado com aquecimento por 30 minutos a 56 C, soro de cabra a 1% inativado por aquecimento durante 30 minutos a 56 C. A seguir foram lavadas com PBS 3 vezes por 10 minutos, sob leve agitação.

Após os procedimentos acima, as secções foram incubadas à temperatura ambiente em câmara úmida, com anticorpo monoclonal anti CD4+ (contra linfócito T4+ auxiliar-indutor); anti CD8+ (contra linfócito T8+ citotóxico-supressor), anti CD11+ (contra todos os linfócitos), B (contra célula B) e macrófago (contra macrófago) diluídos em PBS contendo 2% de albumina bovina e 10% de soro AB e 1% de soro de cabra, a temperatura ambiente em câmara úmida. Todos estes anticorpos foram obtidos comercialmente da DAKO CORP.(Santa Barbara, CA, USA).

Em seguida as secções foram lavadas com PBS durante 10 minutos, 3 vezes sob agitação constante e incubadas com conjugado antiespécie polivalente marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) na diluição apropriada por 30 minutos em temperatura ambiente, em câmara úmida escura. Depois as secções foram lavadas com PBS por 10 minutos, 3 vezes sob leve agitação.

As lâminulas foram montadas com glicerina alcalina e observadas ao microscópio com luz ultra-violeta e com epi-iluminação. Para adequada quantificação, foram contadas todas as células das secções e aferida a área da biópsia.

B.2 - DETERMINAÇÃO DO DEPÓSITO DE IMUNOGLOBULINAS E COMPLEMENTO(C3).

Após o corte em criostato, as secções de tecido com espessura de 4 micras, foram deixadas para secar ao ar e posteriormente fixadas em acetona gelada por 5 minutos. Após foram lavadas em PBS durante 5 minutos, duas vezes sob constante agitação. A seguir, as secções foram incubadas com conjugado antihumano marcado com isotiocinato de fluoresceína em câmara úmida a 37°C por 30 minutos com os seguintes anticorpos anti-C3c a 1:40 (Anti-human-C3c); anti-IgM 1:100 (m-chain); anti-IgA a 1:80 (alfa chain); anti-IgG 1:150 (alfa chain). Estes anticorpos foram obtidos comercialmente da Behringwerk AG, Malburg, Alemanha. A seguir foram lavadas em PBS por 10 minutos, 3 vezes, sob constante agitação. Após, as lamínulas foram montadas com glicerina alcalina e examinadas em microscópio de imunofluorescência com luz ultra-violeta, e epi-iluminação.

C-MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO.

Parte dos blocos do tecido muscular que estavam armazenados em nitrogênio líquido, foram processados para microscopia eletrônica, afim de estudar os vacúolos que sugeriam corpos de inclusão citoplasmática sob o ponto de vista ultramicroscópico.

Os blocos de tecido muscular foram fixados em glutaraldeído a 2,5% em cacodilato a 0,15 M com pH 7,4% à 4°C por 90 minutos e transformados em fragmentos de 2 x 2 mm. Após, foram lavados com solução de sacarose por três vezes em um minuto cada lavagem. Posteriormente os fragmentos foram pós-fixados em 0,5 ml de tetróxido de ósmio à 4% com 1,5 ml de solução de sacarose por 60 minutos e lavados com solução de sacarose três vezes por um minuto e contrastado em uranila "overnigh". No seguimento, foram lavados com solução de sacarose por três vezes durante cinco minutos e desidratados com acetona a 30%, 50%, 70%, 90%, e duas vezes à 100%. Os fragmentos permaneceram 10 minutos em cada diluição.

A inclusão do material foi feita em resina polylyte e polimerizada no peróxido de benzoila anidro. Em seguida, as cápsulas foram colocadas para estufa em 60°C por 72 horas. Depois, os blocos foram cortados e as secções obtidas foram contrastadas com uranila e solução de Reynolds sendo a seguir observadas no microscópio eletrônico (EM 300 da Philips). As alterações de interesse para o estudos eram fotografadas. A análise se concentrou principalmente nos núcleos, regiões peri-nucleares e vacúolos, procurando encontrar os corpos de inclusão e análise do material existente dentro dos vacúolos.

Não foi possível analisar as mitocôndrias em todos os casos, pois devido à congelação prévia, existiam artefatos que prejudicaram a análise.

5. CARACTERIZAÇÃO DIAGNÓSTICA

Para caracterização e melhor compreensão dos casos, utilizamos os seguintes critérios para diagnóstico, nas doenças que apresentavam corpos de inclusão citoplasmática e que estão envolvidos em nosso estudo.

1. Miosite com corpos de inclusão citoplasmática (MCIC):

- Critérios clínicos:
 - início após os 50 anos;
 - evolução lenta (acima de um ano);
 - ausência de reflexo patelar;
 - ausência da história familiar.
- Critérios laboratoriais
 - creatinoquinase normal ou discretamente elevada
- Critérios neurofisiológicos
 - padrão miopático, desinervação ou misto na eletromiografia;
 - velocidades de conduções nervosas normais ou limítrofes.
- Critérios Histológicos
 - um ou mais vacúolo por pequeno aumento;
 - um ou mais grupos de fibras atroficas por pequeno aumento;
 - infiltrado inflamatório focal ou difuso;
 - filamentos intracitoplasmáticos na microscopia eletrônica;
 - filamentos intranucleares na microscopia eletrônica.

2. Atrofia muscular espinhal juvenil

- Critérios clínicos
 - início geralmente nos primeiros anos de vida;
 - usualmente a evolução é lenta;
 - predomínio da fraqueza é proximal e em membros inferiores;
 - herança autossômica recessiva.
- Critérios laboratoriais
 - creatinoquinase normal ou com moderada elevação.
- Critérios neurofisiológicos
 - padrão de desinervação recente e crônica.
- Critérios histológicos
 - fibras hipertróficas e em segmentação;
 - pequenos e grandes grupos de fibras atroficas;
 - fibras anguladas atroficas;

- agrupamentos de tipo específico de fibras;
- predomínio de fibras do tipo 2;
- grumos nucleares.

3- Miopatias distais

- Critérios clínicos
 - início tardio;
 - evolução lenta;
 - fraqueza distal inicialmente em pés e mãos;
 - geralmente herança autossômica recessiva.
- Critérios laboratoriais
 - creatinoquinase normal ou com moderada elevação.
- Critérios neurofisiológicos
 - padrão de miopático na eletromiografia;
 - velocidade de conduções nervosas normais.
- Critérios histológicos
 - fibras hipertróficas e atroficas;
 - fibras anguladas atroficas;
 - ocasionais núcleos centrais;
 - necrose e fagocitose discreta;
 - fibras em segmentação;
 - predomínio e atrofia de fibras do tipo 1;
 - aumento focal importante na fosfatase ácida.

4. Distrofia de cinturas pélvica e escapular.

- Critérios clínicos:
 - idade de início variável, usualmente na segunda e terceira década;
 - evolução lenta;
 - fraqueza muscular de predomínio proximal;
 - herança autossômica recessiva.
- Critérios laboratoriais:
 - creatinoquinase com aumento moderado a elevado.
- Critérios neurofisiológicos
 - padrão miopático na eletromiografia;
 - velocidade de conduções nervosas normais.
- Critérios histológicos
 - hipertrofia de fibras e fibras em segmentação;
 - moderado predomínio de fibras tipo 1;
 - núcleos internos;
 - moderado número de fibras em necrose e fagocitose;
 - fibras em sacabocados e enrodilhados

5. Neuropatia periférica de etiologia não determinada

-Critérios clínicos

- idade de início variável;
- evolução lenta;
- ausência de reflexos profundos;
- hipoestesia distal;
- ausência de história familiar.

-Critérios laboratoriais

- creatinquinase normal ou discretamente elevada;
- elevação dos níveis de proteína no líquido.

-Critérios Neurofisiológicos

- padrão de desinervação na eletromiografia;
- velocidade de condução nervosa reduzidas.

-Critérios Histológicos

- fibras hipertróficas;
- fibras anguladas atróficas;
- agrupamento de tipo específico de fibras;
- pequenos e grandes grupos de fibras atróficas;
- grumos nucleares;
- fibras em alvo.

RESULTADOS

1. DIAGNÓSTICOS

Preenchendo os critérios previamente descritos em material e métodos, e utilizando os resultados que serão descritos em seguida, encontramos os seguintes resultados:

Miosite com corpos de inclusão citoplasmática

4 pacientes - casos 1, 2, 3, 4.

Atrofia muscular espinhal juvenil

: 6 pacientes - casos 5, 6, 7, 8, 9, 10.

Miopatias distais:

3 pacientes. - casos 11, 12, 13.

Distrofia muscular de cinturas pélvica e escapular

2 pacientes caso -14,15.

Neuropatia periférica de etiologia não determinada

1 paciente - caso 16

2. INVESTIGAÇÃO LABORATORIAL

A maioria dos exames laboratoriais estavam dentro dos valores da normalidade, exceto a velocidade de hemossedimentação na primeira hora, que se mostrou elevada nos casos 2 (53 mm) e 3 (52 mm).

A creatinoquinase mostrou-se elevada nos casos 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 16. A desidrogenase láctica mostrou-se elevada nos casos 1, 6 e 8. A aldolase nos casos 1, 13 e 16. A transaminase glutâmica oxalacética mostrou-se elevada nos casos 1 e 8. A transaminase glutâmico pirúvica esteve elevada no caso 8 (Tabela 2).

Tabela 2
RESULTADOS DAS ENZIMAS SÉRICAS

Caso número	CK	DHL	Aldolase	TGO	TGP
1	3	1	1	2	N
2	0,7	N	N	N	N
3	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N
6	10	1	3	-	-
7	5,5	-	-	-	-
8	9	0,5	-	1	0,5
9	3	N	N	N	N
10	3	N	N	N	N
11	1,5	N	N	N	N
12	1,3	N	N	N	N
13	0,6	N	0,2	N	N
14	6,6	-	-	-	-
15	N	N	N	N	N
16	1,5	N	1	N	N

CK = Creatinaquinase; DHL = Desidrogenase láctica; TGO = Transaminase glutâmica oxalo-acética; TGP = Transaminase glutâmico pirúvica; N = Normal; - = Não realizado. Valores correspondem ao número de vezes aumentado em relação aos valores normais.

Todas as punções lombares realizadas nos oito casos tiveram a pressão inicial, final e as provas de permeabilidade do canal medular normais. O número de células estava normal e os níveis de glicose estavam normais em todos os casos. A sorologia para cisticercose e sífilis foram negativas em todos os casos. A proteína esteve elevada apenas no caso 16 (85 mg/dl).

3. ELETRONEUROMIOGRAFIA

As velocidades de condução nervosa mostraram-se reduzidas (discretamente < 10%) em nervos e ulnar motor direito no caso 16, fibular direito no caso 16 (Tabela 3).

TABELA 3
VELOCIDADES DE CONDUÇÃO NERVOSA (Metros/segundo)

CASO	MEDIANO		ULNAR	FIBULAR	TIBIAL POSTERIOR	SURAL
	Motor	Sensitivo	Motor	Motor	Motor	Sensitivo
1	54	NR	55	41	NR	NR
2	49	NR	NR	42	NR	NR
3	66	NR	64	52	NR	NR
4	54	NR	58	45	NR	NR
5	55	NR	55	49	NR	NR
6	59	NR	NR	56	NR	NR
7	59	NR	NR	49	NR	NR
8	57	NR	60	62	52	53
9	53	NR	NR	43	NR	NR
10	58	NR	59	50	50	NR
11	55	50	NR	50	NR	42
12	NR	NR	NR	NR	NR	NR
13	57	62	NR-	53	NR	NR
14	48	NR	49	43	50	NR
15	58	58	58	52	NR	55
16	56	NR	42	35	NR	NR

NR= Não realizada. Valores normais: n. mediano motor = 48 m/s, ulnar motor= 49 m/s, fibular profundo= 40 m/s, tibial posterior= 41 m/s, mediano sensitivo= 50 m/s, sural= 40 m/s.

Foram encontrados seis casos com eletromiografia de padrão miopático, cinco com padrão de desinervação e quatro com padrão neuromiopático (Tabela 4)

Tabela 4
RESULTADO ELETROMIOGRAFIAS

Caso Número	DIAGNÓSTICO ELETROMIOGRÁFICO
1	Desinervação Ativa e Crônica
2	Neuromiopática
3	Neuromiopática
4	Miopática
5	Miopática
6	Neuromiopática
7	Desinervação Ativa e Crônica
8	Neuromiopática
9	Desinervação Ativa e Crônica
10	Desinervação Ativa e Crônica
11	Miopática
12	NR
13	Miopática
14	Miopática
15	Miopática
16	Desinervação Ativa e Crônica

NR= Não realizada.

4. BIÓPSIA MUSCULARES A FRESCO E HISTOQUÍMICA

Na tabela 5, estão relacionadas todas as alterações histológicas encontradas nos 16 casos.

Tabela 5

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ESPECÍFICAS								
CASO NÚMERO	1	2	3	4	5	6	7	8
Músculo estudado	quadric eps	gastroc nemio	biceps	biceps	quadric eps	gastroc nemio	quadric eps	quadric eps
HEMATOXILINA-EOSINA E TRICROMO DE GOMORI MODIFICADO								
Proliferação tecido conjuntivo	+	+	++	+	++	++	++	+
Infiltração tecido adiposo	0	0	0	0	+	0	0	+
Variação diâmetro fibras	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Diâmetro máximo (micra)	160	160	100	180	160	140	250	110
Diâmetro mínimo (micra)	20	10	10	12	10	15	20	5
Grandes aglomerados fibr. atroficas	0	+	0	0	0	+	0	0
Pequenos aglomerados fibr. atroficas	0	++	++	0	+	+	++	+
Fibras anguladas atroficas	++	++	+	0	++	++	++	++
Fibras redondas atroficas dispersas	++	++	++	++	++	+	++	++
Fibras hipertróficas dispersas	++	++	++	++	++	+	++	+
Núcleos centrais (%)	++	+	0	+	0	++	+++	+
Grumos nucleares	0	0	0	0	+	0	+	+
Necrose	++	+++	+++	++	+	+	+	0
Fagocitose	++	++	+++	++	+	+	+	++
Infiltrado inflamatório difuso	+	+	++	0	0	0	0	+
Infiltr. infl. desproporcional à necrose	+	0	++	+	0	0	0	++
Vacúolos	++	++	++	++	++	+++	+++	++
Corpos inclusão citoplasmáticos	++	++	++	++	++	+	+++	+
Fibras basofílicas	++	0	+	0	0	0	+	0
Fibras hipercontráteis	0	+	0	0	0	0	0	+++
Massas sarcoplásmicas	0-	0	+	0	0	+	0	+++
Segmentações	0	+	0	+	0	++	+++	0
NADH-TETRAZOLIUM REDUCTASE								
Fibras angulares atroficas	+++	++	+	0	+++	+++	++	+++
Saca-bocados	+	+	0	+	0	0	+	0
Turbilhões	0	0	0	+	0	+++	+	+
Enrodilhamentos	0	+	0	0	0	++	0	0
Anéis	0	0	0	0	0	++	0	+++
Aumento focal de NBT reduzido	0	+++	0	0	0	0	+++	++
ATPASES pH 9,4,4,3, e 4,6								
Agrupamentos	0	+	0	0	+	0	0	0
Atrofia de fibras do tipo I	+	+	+	+	+	++	+	++
Atrofia de fibras do tipo II	0	+++	+++	+	0	0	+	+
Hipertrofia de fibras do tipo I	+	+	+	+	0	+	+	0
Hipertrofia de fibras do tipo II	+	+	0	+	+	+	+	+
Predomínio de fibras do tipo I	0	0	0	+	0	0	+	0
Predomínio de fibras do tipo II	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 5 (Continuação)

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ESPECÍFICAS								
CASO NÚMERO	1	2	3	4	5	6	7	8
Músculo estudado	quadric eps	gastroc nemio	biceps	biceps	quadric eps	gastroc nemio	quadric eps	quadric eps
ESTERASE INESPECÍFICA								
Fibras angulares atroficas	+++	+	+	0	+++	+++	+++	+++
Aumento da atividade no interstício	0	0	0	+	0	0	0	0
FOSFATASE ÁCIDA								
Aumento focal fibras	++	+++	++	+	+	++	+++	+++
Fibras positivas	++	++	++	+	+	0	++	++
Aumento no interstício	0	0	0	0	0	0	0	0
Aumento em mononucleares	0	+	++	+	+	+	++	0
FOSFATASE ALCALINA								
Fibras positivas	++	+	++	+	0	+	+++	0
Aumento no interstício	0	0	0	0	0	0	0	++
Aumento nos nervos	0	0	0	0	0	0	0	+
OIL RED O								
Aumento de gotículas em fibr. tipo 1.	0	0	0	0	0	+	0	0
DESIDROGENASE SUCCÍNICA								
Acúmulo sub-sarcolemal	0	++	0	0	0	0	0	0
Acúmulo focal celular	0	0	0	0	0	0	0	+
Aumento do volume de grânulos	0	0	0	0	0	0	0	0
CITOCROMO-C -OXIDASE								
Acúmulo sub-sarcolemal	NR	0	NR	NR	NR	NR	0	0
Ausência de atividade	NR	0	NR	NR	NR	NR	0	+
SIRIUS RED								
Aumento no tecido intersticial	NR	+	NR	NR	NR	NR	+	0
ADENILATO DEAMINASE								
Deficiência em fibras	NR	0	NR	NR	NR	NR	NR	0

NR = Não realizada; 0 = Ausente ou normal; + = Discreto ou raro; ++ = Ocasional ou moderado; +++ = Severo, frequente ou abundante.

Tabela 5 (Continuação)

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ESPECÍFICAS								
CASO NÚMERO	9	10	11	12	13	14	15	16
Músculo estudado	quadric eps	biceps	quadric eps	quadric eps	quadric eps	triceps	biceps	gastroc cnemio
HEMATOXILINA-EOSINA E TRICROMO DE GOMORI MODIFICADO								
Proliferação tecido conjuntivo	+	0	+	++	+	++	++	+++
Infiltração tecido adiposo	+	0	+	++	+	+	+	++
Variação diâmetro fibras	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Diâmetro máximo (micra)	200	120	100	160	160	200	140	140
Diâmetro mínimo (micra)	10	30	8	5	7	20	10	5
Grandes aglomerados fibr. atroficas	+	0	0	0	0	0	0	+
Pequenos aglomerados fibr. atroficas	+	0	++	0	0	0	+	+
Fibras anguladas atroficas	++	++	+	++	++	0	+	0
Fibras redondas atroficas dispersas	++	0	++	++	++	++	+	++
Fibra hipertrófica dispersa	++	0	+	++	++	++	+	++
Necrose	+	++	+	+	+	+++	++	0
Fagocitose	+	++	+	+	+	+++	++	0
Infiltrado inflamatório difuso	++	0	0	0	0	+	0	0
Infil. infl. desproporcional à necrose	++	0	0	+	0	+	0	0
Núcleos centrais (%)	++	++	+	0	++	++	++	+
Grumos nucleares	0	0	0	0	+	+	+	+
Basofilia	+	0	0	0	+	0	0	0
Fibras hipercontráteis	++	0	0	0	0	0	0	0
Massas sarcoplásmicas	+	0	0	0	++	0	+	0
Vacúolos	++	+	+	+++	++	+	+	+
Corpos inclusão citoplasmáticos	++	+	+	++	++	++	+	++
Segmentações	+	0	++	0	+	+++	++	0
NADH-TETRAZOLIUM REDUCTASE								
Fibras angulares atroficas	+++	+	+	++	+	0	+++	0
Saca-bocados	0	+	0	0	+++	++	+++	0
Turbilhões	0	0	0	0	0	0	+++	+
Enrodilhamentos	0	0	0	0	0	0	0	0
Anéis	0	0	0	0	+++	0	0	0
Aumentofocal NBT reduzido na fibra	0	0	++	+	++	0	++	0
ATPASES pH 9,4,4,3, e 4,6								
Agrupamentos	0	0	0	0	0	0	0	0
Atrofia fibras tipo I	+	+	++	++	+	+	++	+
Atrofia fibras tipo II	0	++	0	0	0	+	0	+
Hipertrofia fibras tipo I	0	0	+	0	+	+	0	0
Hipertrofia fibras tipo II	0	+	+	0	++	+	+	+
Predomínio fibras tipo I	0	0	0	0	+	0	+	0
Predomínio fibras tipo II	+	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 5 (Continuação)

ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS ESPECÍFICAS								
CASO NÚMERO	9	10	11	12	13	14	15	16
Músculo estudado	quadric eps	biceps	quadric eps	quadric eps	quadric eps	triceps	biceps	gastroc cnemio
ESTERASE INESPECÍFICA								
Fibras angulares atroficas	+++	++	+	+++	+	0	+++	0
Aumento atividade interstício	0	0	0	0	0	0	0	0
FOSFATASE ÁCIDA								
Aumento focal fibras.	+	++	+++	++	+++	++	+	+
Fibras positivas	++	+	+	++	0	0	0	++
Aumento interstício	0	0	0	+	0	++	+	0
Aumento fagócitos mononucleares	++	+	0	+	++	0	+	0
Aumento nervos	0	0	0	0	0	0	0	0
FOSFATASE ALCALINA								
Fibras positivas	++	0	0	+	0	++	+	+
Aumento interstício	0	0	0	0	++	+	0	0
Aumento nervos	0	0	0	0	0	0	0	0
OIL RED O								
Aumento gotículas fibras tipo 1.	0	0	0	0	0	0	+	0
DESIDROGENASE SUCCÍNICA								
Acúmulo sub-sarcolema.	0	+	0	0	++	+	0	0
Acúmulo focal celular.	0	0	0	+	++	+	+	0
Aumento volume grânulos	NR	0	++	0	0	0	+	0
CITOCROMO-C-OXIDASE								
Acúmulo sub-sarcolema	NR	+	NR	NR	0	+	NR	NR
Fibrose	NR	0	NR	NR	0	0	NR	NR
SIRIUS RED								
Aumento tecido intersticial	NR	0	NR	NR	+	+	NR	NR
ADENILATO DEAMINASE								
Deficiência em fibras	NR	0	NR	NR	0	NR	NR	NR

NR = Não realizada; 0 = Ausente ou normal; + = Discreto ou raro; ++ = Ocasional ou moderado; +++ = Severo, frequente ou abundante.

Os elementos isolados das biópsias foram a seguir avaliados, tendo em vista a presença e intensidade das anormalidades encontradas, recebendo um diagnóstico anatomopatológico específico, conforme a sua presença ou ausência, bem como em relação à intensidade que ocorreram (Tabela 6, Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16).

Tabela 6

RESULTADO DAS BIÓPSIAS MUSCULARES	
Caso numero.	Diagnóstico Anatomopatológico
1	Mista, predomínio de miopatia inflamatória
2	Miopatia inflamatória
3	Miopatia inflamatória
4	Miopatia crônica inflamatória
5	Desinervação crônica
6	Mista, predomínio de miopatia
7	Mista, predomínio de desinervação
8	Mista, predomínio de desinervação
9	Mista, predomínio de desinervação
10	Desinervação recente
11	Miopatia crônica e ativa
12	Mista, predomínio de miopatia
13	Miopatia crônica e ativa
14	Miopatia crônica e ativa
15	Mista sem predomínio
16	Mista, predomínio de miopatia

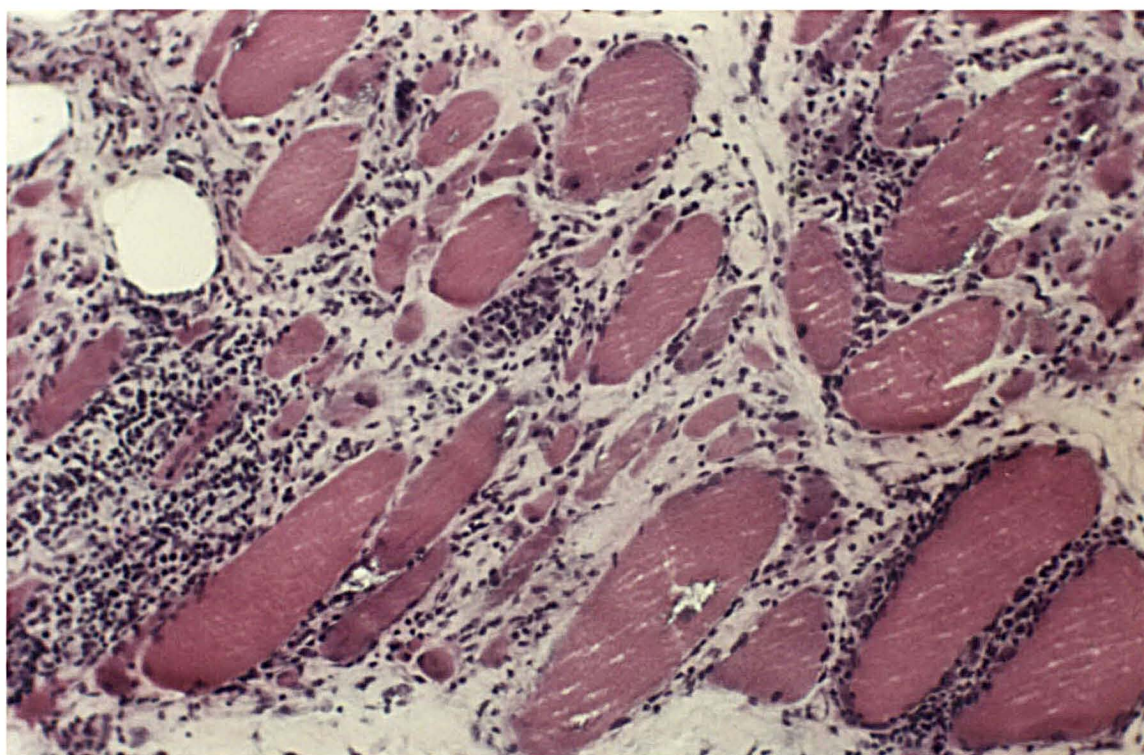


Figura 1 - Infiltrado inflamatório difuso intersticial por mononucleares; fibras necróticas com fagocitose; vacúolos ocasionais. Presença de alguns artefatos de corte e congelamento. Hematoxilina-Eosina, 174 x. (Miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Caso 3).

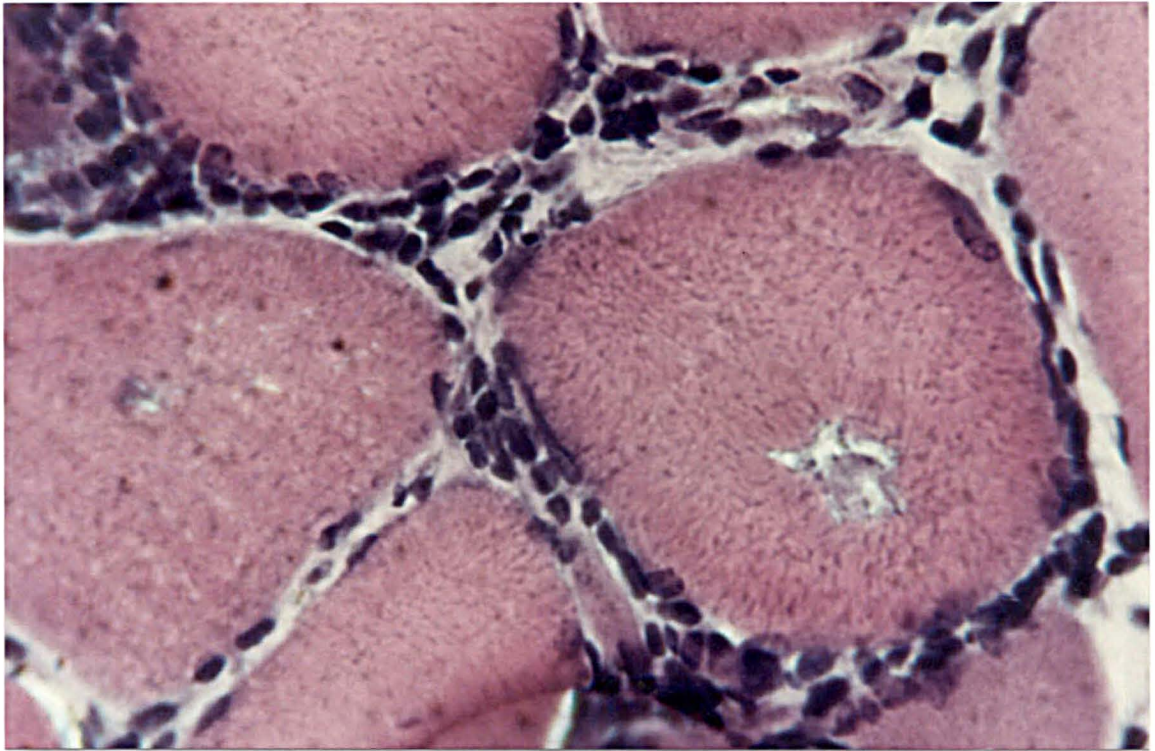


Figura 2 - Infiltrado inflamatório intersticial por mononucleares, com vacúolo em uma fibra muscular. Hematoxilina-Eosina, 696 x.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática.- Caso 3).

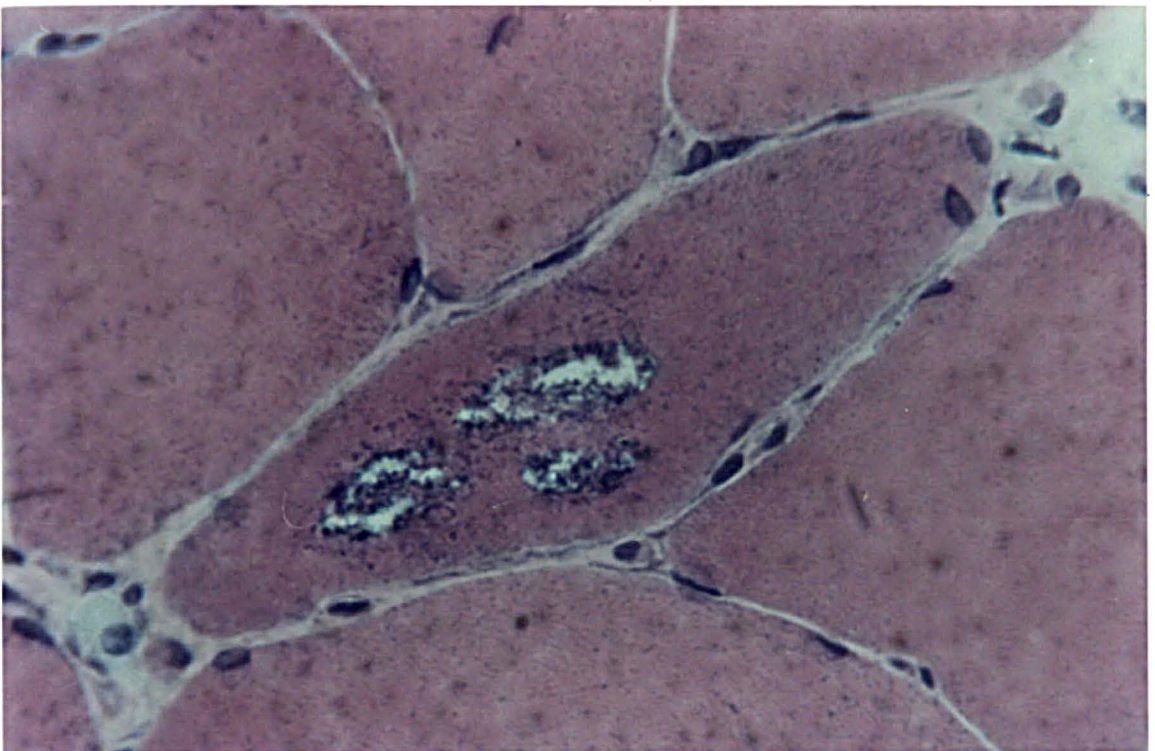


Figura 3 -Fibras hipertróficas. Vacúolos marginados no centro da fibra com parede de aspecto grumoso e conteúdo espumoso basofílico.
Hematoxilina-Eosina, 348 x.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática.- Caso 2).

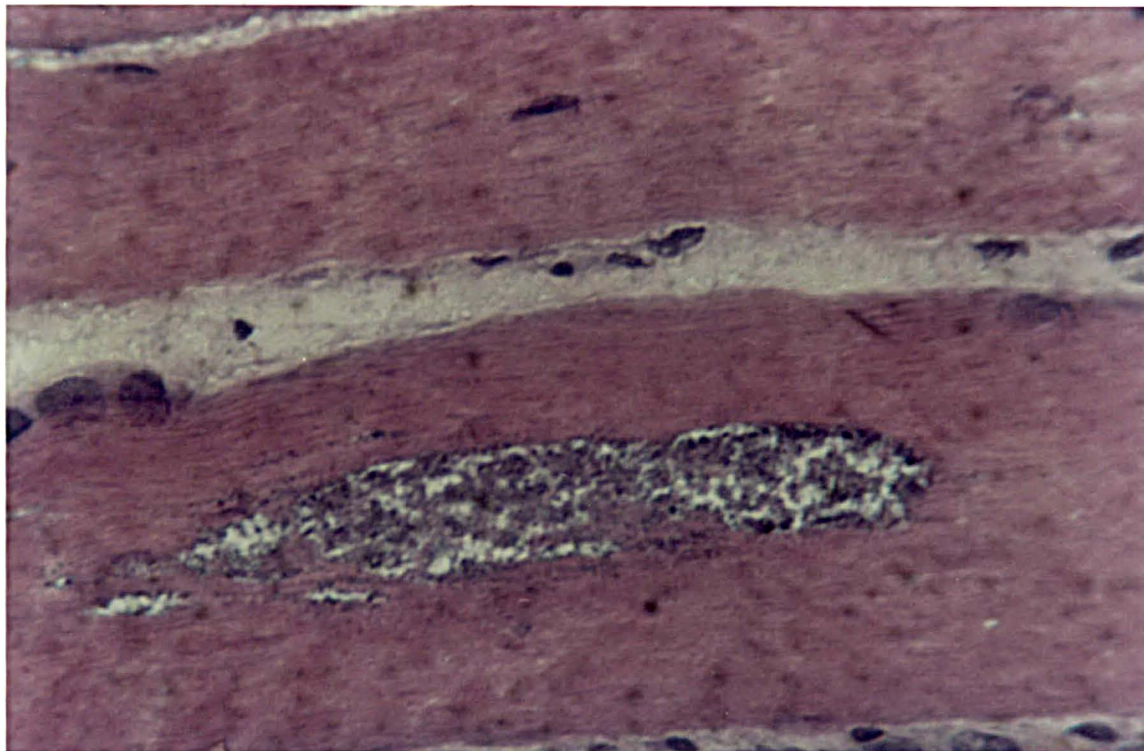


Figura 4 - Corte longitudinal da fibra. Vacúolo marginado contendo material grumoso basofílico no seu interior. Hematoxília-Eosina, 696 x.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática - Caso 4.)

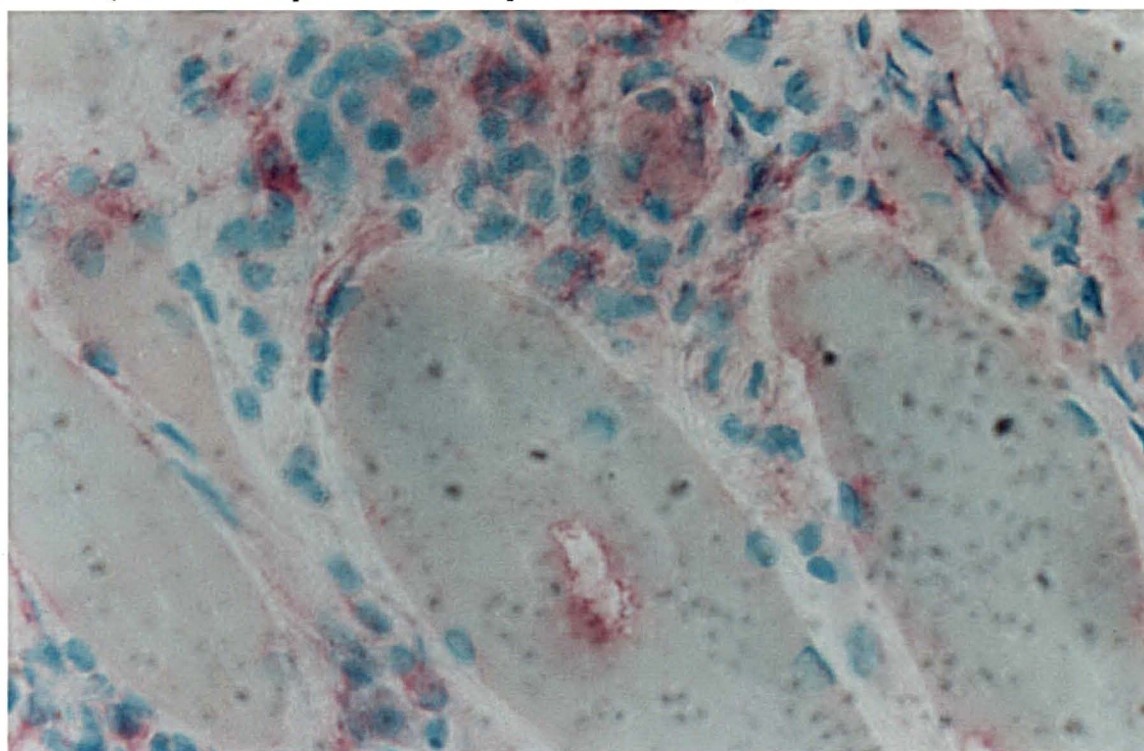


Figura 5 - Corte oblíquo das fibras. Fibras atróficas, fibra positiva, infiltrado inflamatório, macrófagos, atividade aumentada no interstício e fagócito, vacúolo com atividade positiva apenas na parede e ausência no interior. Fosfatase Ácida, 696 x.
(Atrofia muscular espínhal juvenil.- Caso 3).

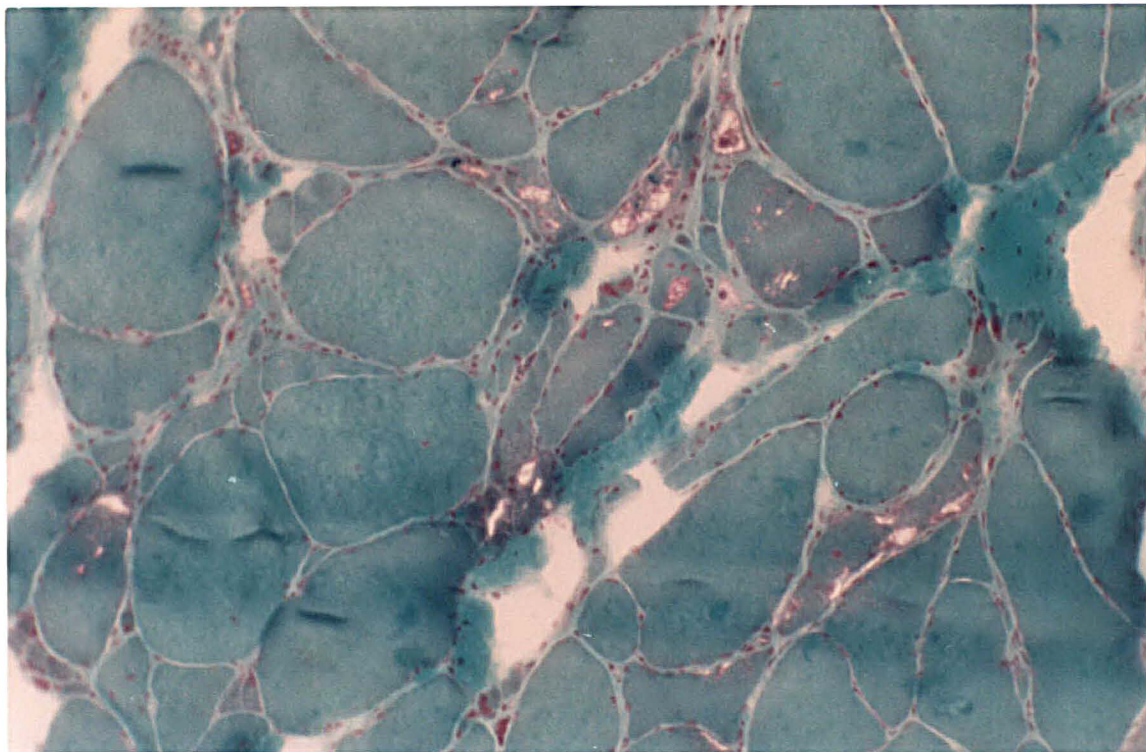


Figura 6 - Discreto aumento tecido conjuntivo endomesial. Moderado Infiltrado tecido adiposo. Fibras atróficas e fibras hipertróficas. Grande número de fibras contendo vacúolos margindos com localização diversa no interior das fibras. Tricromo de Gomori Modificado, 174 x. (Atrofia muscular espinhal juvenil- Caso 9).

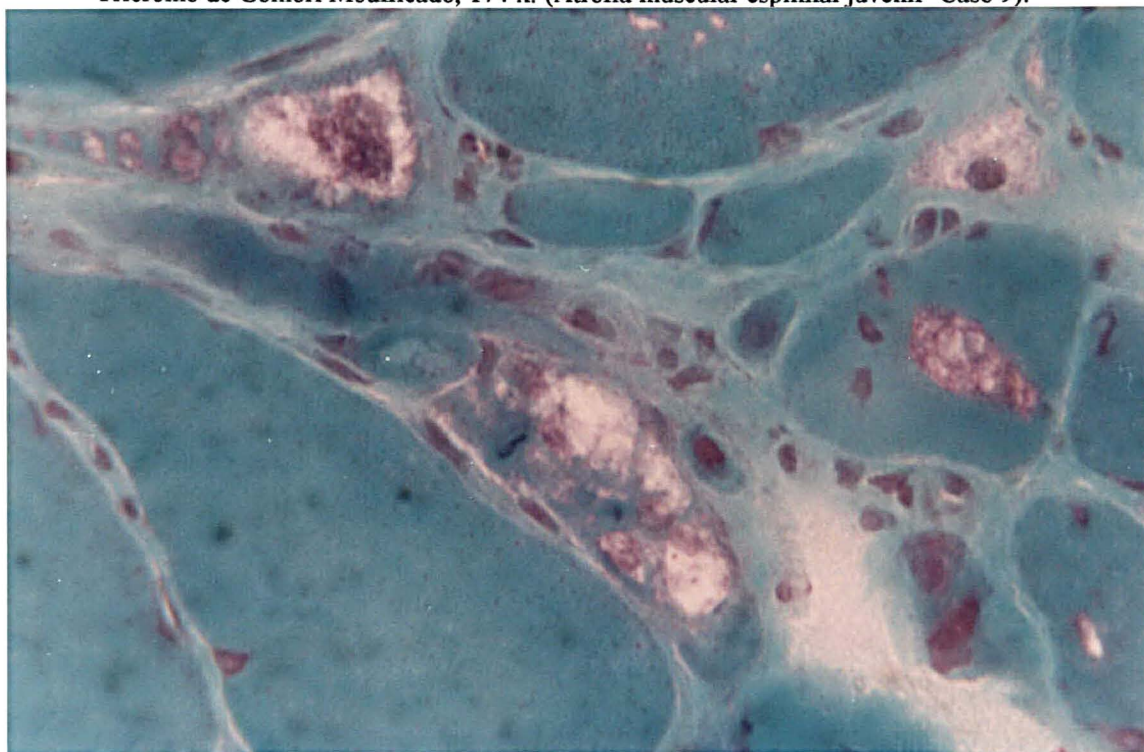


Figura 7 - Discreto aumento do tecido conjuntivo endomesial, infiltrado por tecido adiposo, fibras atróficas , vacúolos marginados, com material violeta granular. Tricromo de Gomori Modificado 696 x.. (Atrofia muscular espinhal juvenil. Caso 9).

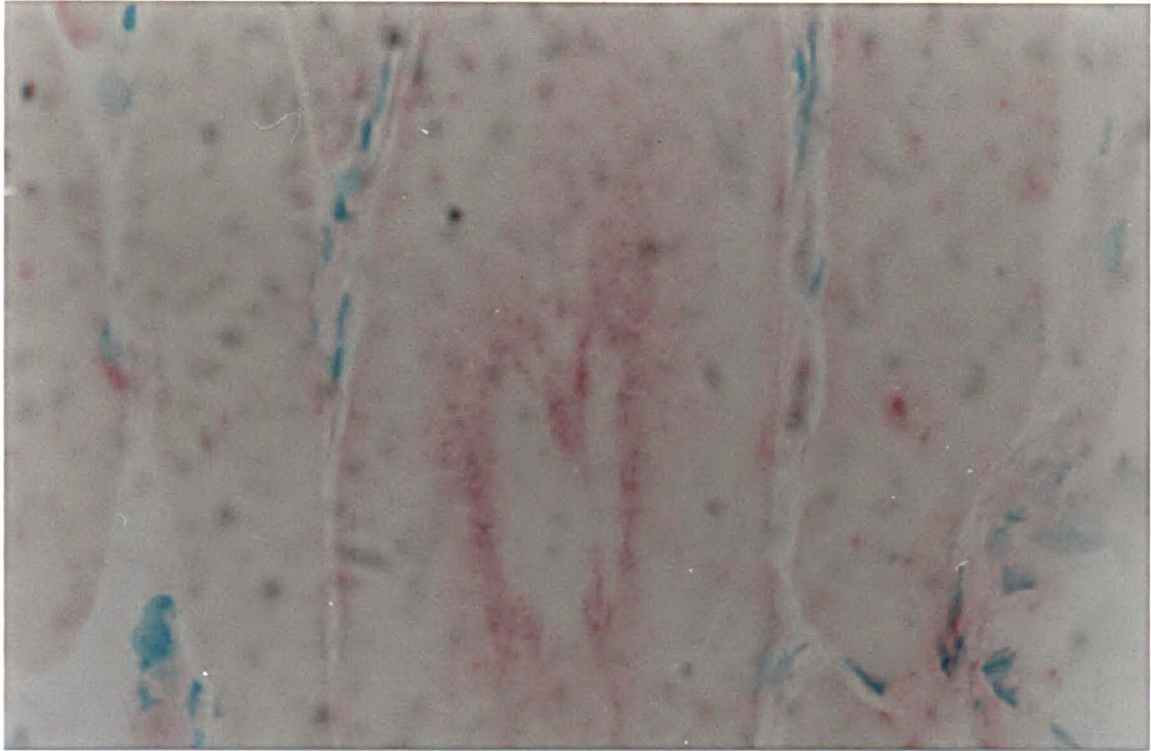


Figura 8 - Corte longitudinal da fibra muscular. Vacúolo com parede positiva .
Fosfatase Ácida, 696 x.
(Atrofia muscular espinhal juvenil. Caso 9).

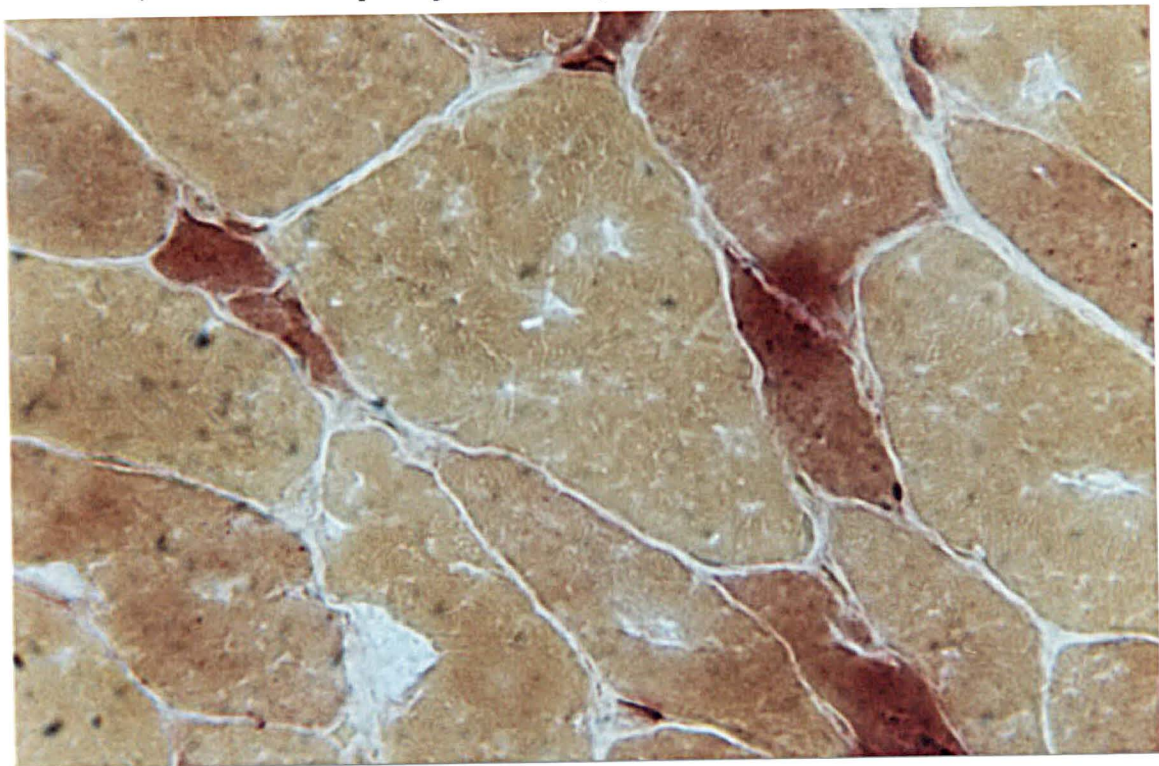


Figura 9.- Fibras angulares atróficas hipercoradas dispersas. Placas motoras
motoras presentes e normais.
Esterase Inespecífica, 696 x.
(Atrofia muscular espinhal juvenil. Caso 6).

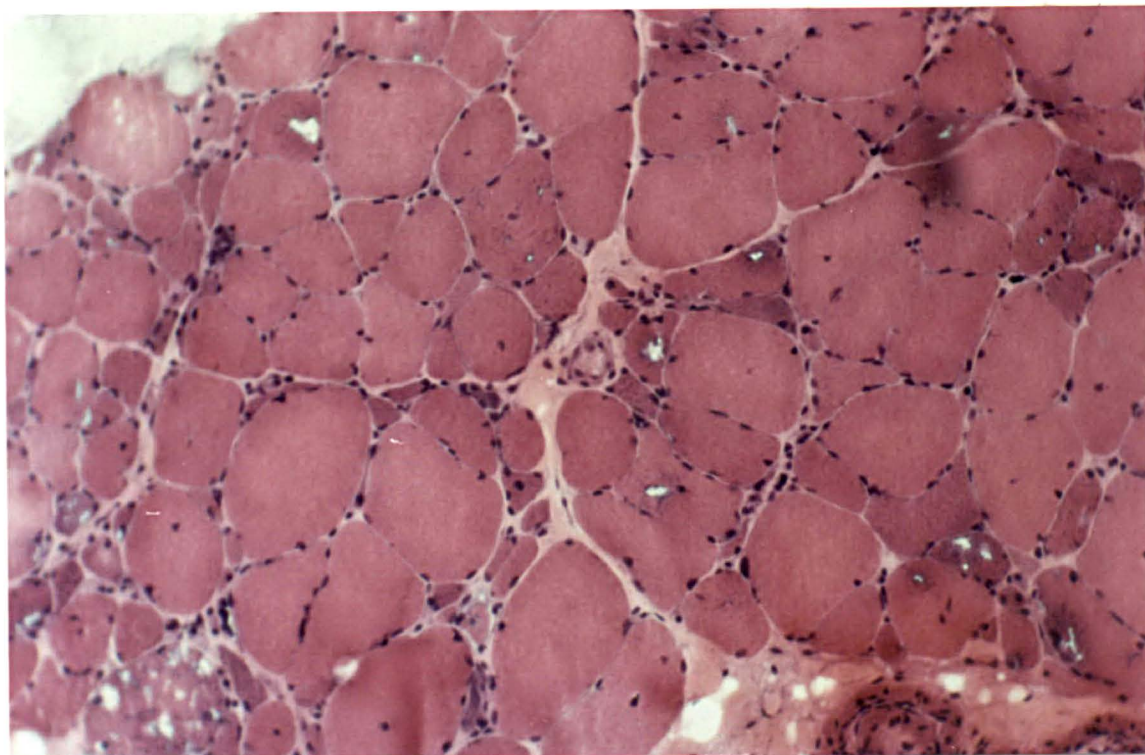


Figura 10 - Discreto aumento do tecido conjuntivo endomesial, fibras hipertróficas, pequenos grupos de fibras atroficas. Vacúolos marginados em várias localizações nas fibras. Hematoxilina-Eosina, 174 x. (Miopatia distal. Caso 6).

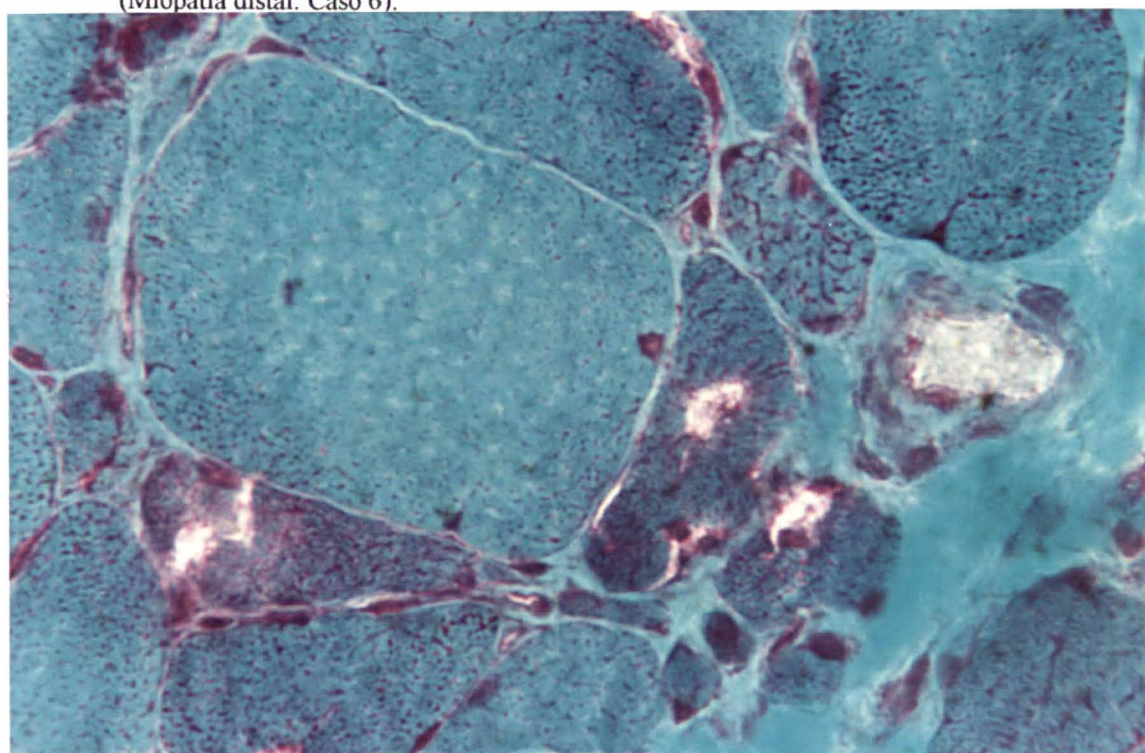


Figura 11 - Discreto aumento do tecido conjuntivo endomesial. Fibras hipertróficas, fibras atroficas. Vacúolos marginados com paredes e material granular interno violáceo. Tricromo de Gomori Modificado, 696 x. (Miopatia distal. Caso 12).

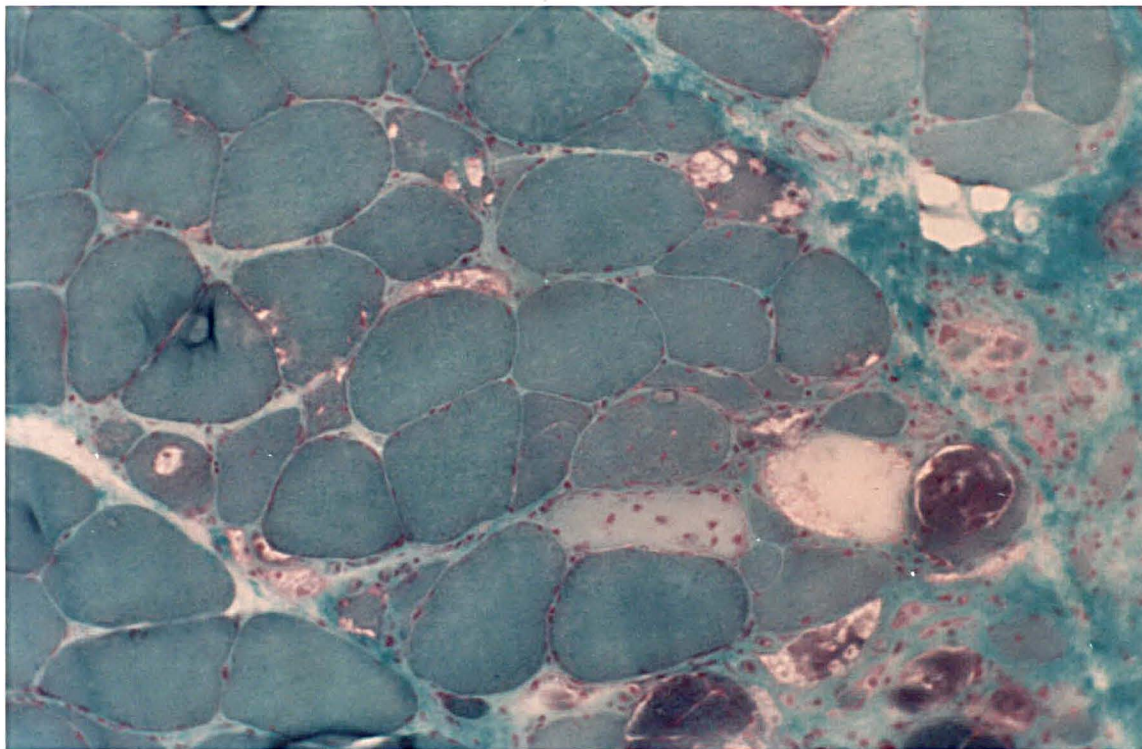


Figura 12 - Discreta proliferação do tecido conjuntivo endomesial, infiltrado por tecido adiposo, fibras hipertróficas, fibras atróficas, necrose simples, fibras em necrose com fagocitose, vacúolos marginados. Tricromo de Gomori Modificado, 348 x. (Distrofia muscular de cinturas pélvica e escapular. Caso 14).

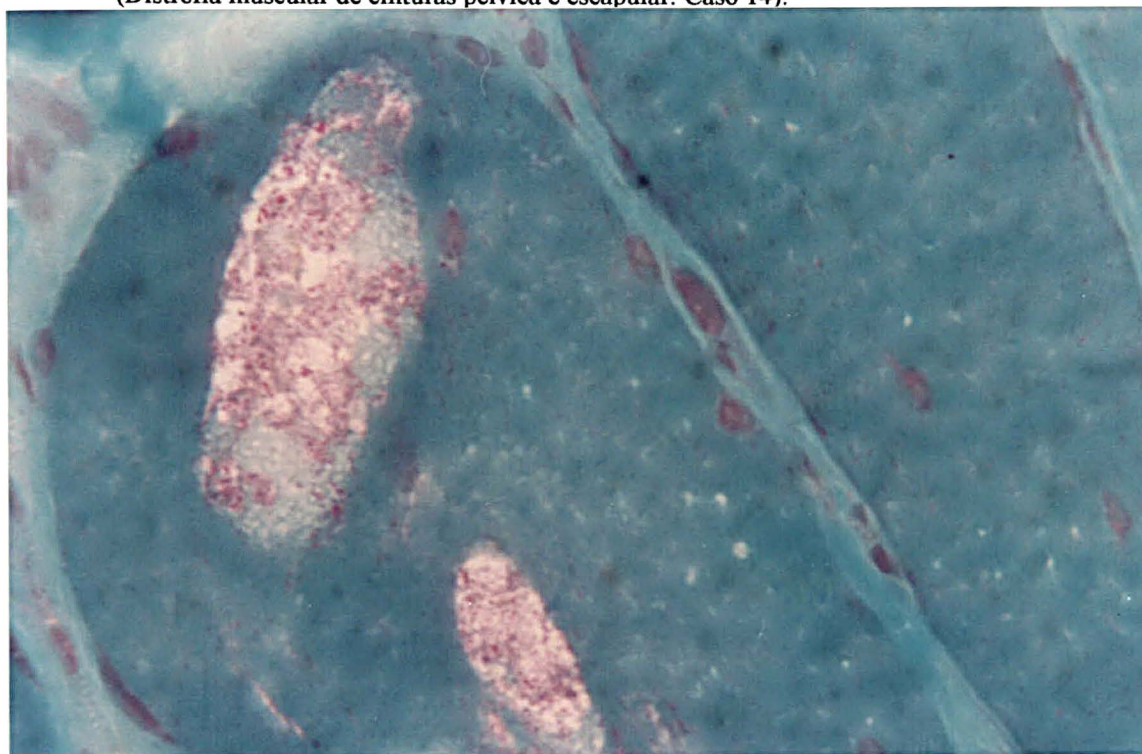


Figura 13 - Fibras hipertróficas. e vacúolo com material grumoso violeta no interior. Tricromo de Gomori, 696 x. (Distrofia muscular de cinturas pélvica e escapular. Caso 15).

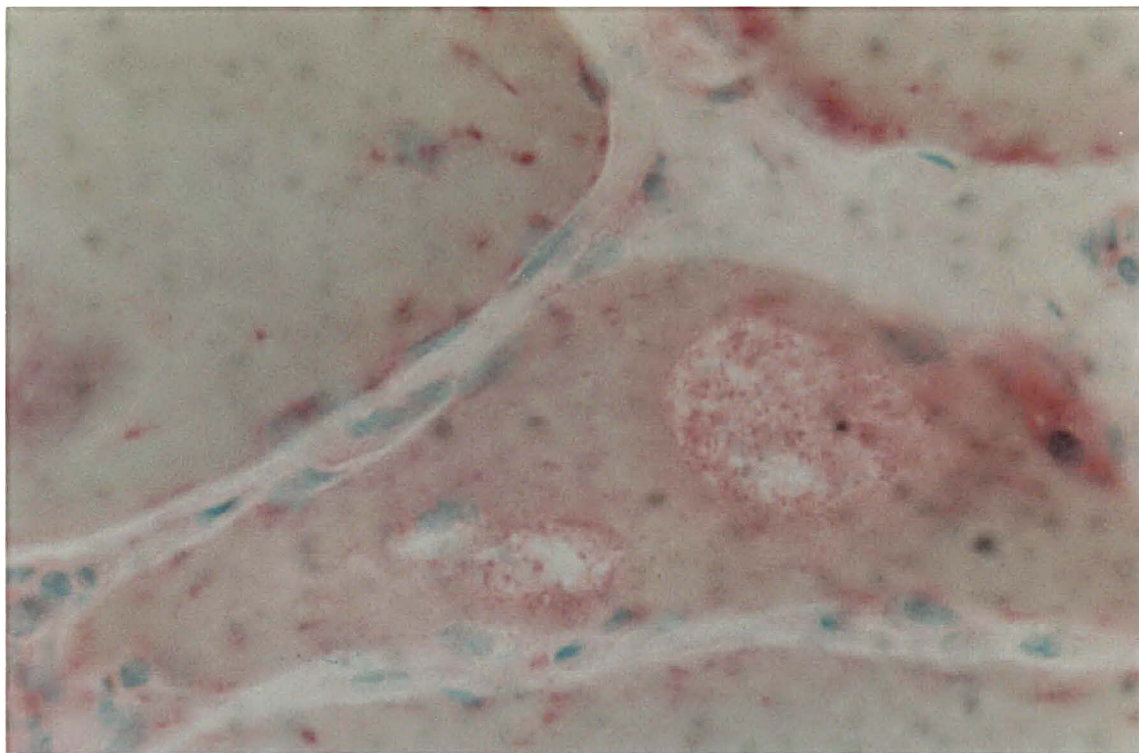


Figura 14 - Fibra com vacúolo com atividade positiva no interior do mesmo.
Fosfatase Ácida, 696 x.
(Distrofia muscular de cinturas pélvica e escapular. Caso 15).

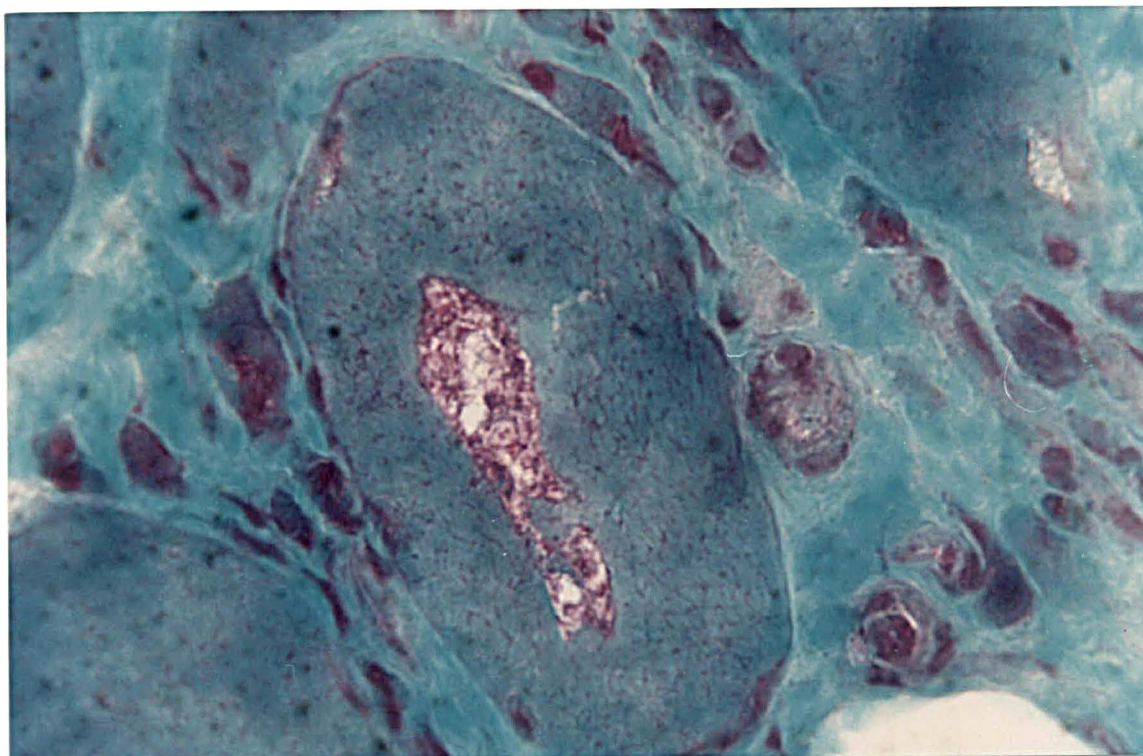


Figura 15 - Proliferação do tecido conjuntivo endomesial, grumos nucleares,
fibras atróficas, vacúolo marginado.
Tricromo de Gomori, 696.
(Neuropatia periférica. Caso 16).

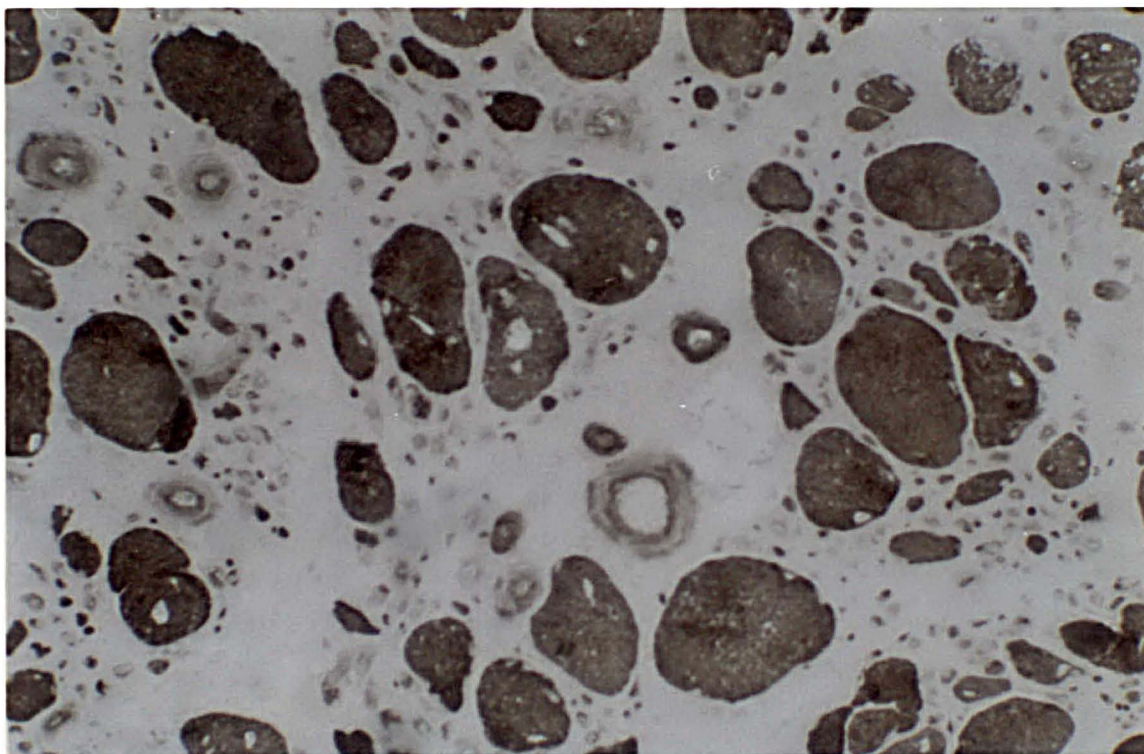


Figura 16 - Atrofia tipo 1 e 2, com hipertrofia de fibras tipo 1.
ATPase 4.6, 174 x.
(Neuropatia periférica. Caso 16).

5. IMUNOCITOQUÍMICA

Nas tabelas 7, 8, 9, 10 e 11, estão relacionados os achados obtidos pela imunofluorescência para linfócitos CD8+, CD4+, CD11+, B, macrófago, complemento C3c, imunoglobulinas A, G e M (Figuras 17,18,19,20,21,22).

Tabela 7
RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

DIAGNÓSTICO : Miosite por corpos de inclusão citoplasmática										
Caso n./ area(mm2)	CD8+	CD4+	CD11+	Cel B	C3	IgA	IgG	IgM	macró- fago	NK
1 / 65										
Interstício	12,3	0,69	0,93	-	-	-	-	-	++	+
Intra-fibra	0	0,06	0,04	-	-	-	-	-	+	-
Perivascular	0	0	0,04	-	-	-	-	-	+	-
Vacúolo					-	-	-	-		-
2/ 29,										
Interstício	0,03	0,31	0,55	-	-	-	-	-	+++	+++
Intra-fibra	0	0	0	-	++	-	++	-	+	-
Perivascular	0,13	0,03	0,24	-	-	-	-	-	-	-
Vacúolo.					-	-	-	-		
3/ 15,										
Interstício	57,5	10,1	145,9	-	-	++	-	-	+++	+++
Intra-fibra	13,8	1,3	61,8	-	+	++	+	+	+	-
Perivascular	0,53	0	15-1	-	-	-	-	-	+	-
Vacúolos					+	-	+	-		
4/ 18,5,										
Interstício	13,2	6,15	40,1	3,72	-	++	-	+	++	-
Intra-fibras	9,13	0,7	8,37	0	-	+	++	-	+	-
Perivascular	0,10	0	0,54	0	-	+	-	+	-	-
Vacúolos					-	+	-	-	-	-

Linfócitos CD8+, CD4+, CD11+ e B : número de células/mm2.

Complemento C3, IgA, IgG , IgM, macrófagos e células NK : intensidade detectada, - = ausente, += raro ou discreto, ++= ocasional ou moderado, +++= severo, frequente ou abundante.

Tabela 8
RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

DIAGNÓSTICO : Atrofia muscular espinhal juvenil										
Caso n./ área(mm2)	CD8+	CD4+	CD11+	Cel B	C3	IgA	IgG	IgM	macró- fagos	NK
5 / 35										
Interstício	2,62	0	0,22	0	0	0	0	+	+	+
Intra-fibras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perivascular	0	0	0	0	0	0	+	+	0	0
Vacúolos				0	0	0	0	0	0	0
6 / 19										
Interstício	1	1,46	0,1	0	0	0	0	0	+++	0
Intra-fibras	0,78	0	0	0	+	0	+	0	0	0
Perivascular	0	0	0	0	+	+	0	0	0	0
Vacúolos					0	0	0	+	0	0
7 / 10,5										
Interstício	2,47	1,3	17,3	0	0	0	0	+	+++	0
Intra-fibras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perivascular	0,19	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacúolos										
8 / 91										
Interstício	0,58	0,46	1,2	0	+	0	+	0	++	0
Intra-fibras	0	0,36	0,43	0	0	0	0	0	+	0
Perivascular	0	0	0	0	+	0	+	+	+	0
Vacúolos					0	0	0	0		
9- / 35,5										
Interstício	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0
Intra-fibras	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0
Perivascular	0	0	0	0	0	+	0	+	0	0
Vacúolos					0	+	0	0		
10 / -41										
Interstício	1,2	0,63	0,07	0	0	0	0	0	++	0
Intra-fibra	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0
Perivascular	0	0	0	0	+	0	+	0	0	0
Vacúolos					0	0	0	0		

Linfócitos CD8+, CD4+, CD11+ e B : número de células/mm2.

Complemento C3, IgA, IgG , IgM, macrófagos e células NK : intensidade detectada, - = ausente, += raro ou discreto, ++= ocasional ou moderado, +++= severo, frequente ou abundante.

Tabela 9
RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

DIAGNÓSTICO : Miopatias distais com vacúolos marginados.										
Caso n./ area(mm2)	CD8+	CD4+	CD11+	Cel B	C3	IgA	IgG	IgM	macró- fagos	NK
11 /51,5										
Interstício	0,21	0	0,38	0	0	++	+	0	+	0
Intra-fibra	0	0	0	0	0	0	++	0	+	0
Perivascular	0,01	0	0	0	+	0	+	+	+	0
Vacúolos					0	0	+	+		
12 /79										
Interstício	0,24	0	2,49	0	+	0	0	0	++	++
Intra-fibra	0	0	0,25	0	0	0	0	0	++	0
Perivascular	0,02	0	0,01	0	0	+	++	0	+	+
Vacúolos					0	0	0	0		
13 /11,5										
Interstício	0,41	0	0,13	046	0	0	0	0	+++	+
Intra-fibra	0,32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perivascular	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0
Vacúolos					0	0	0	0		

Linfócitos CD8+, CD4+, CD11+ e B : número de células/mm2.

Complemento C3, IgA, IgG , IgM, macrófagos e células NK : intensidade detectada, - = ausente, += raro ou discreto, ++= ocasional ou moderado, +++= severo, frequente ou abundante.

Tabela 10
RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

DIAGNÓSTICO: Distrofia muscular de cinturas pélvica e escapular										
Caso n/ área(mm2)	CD8+	CD4+	CD11+	Cel B	C3	IgA	IgG	IgM	macró- fagos	NK
14 / 49										
Interstício	2,24	2,1	0,89	0,06	0	0	0	0	+++	+
Intra-fibra	0,44	1,5	0,04	0	0	0	0	0	+	0
Perivascular	0,14	0,02	0,02	0	0	0	0	0	+	0
Vacúolo					0	0	0	0		
15 / 22										
Interstício	2,09	0	0,59	0	0	0	0	0	+++	0
Intra-fibra	0	0	1	0	0	0	0	+	0	0
Perivascular	0	0	1	0	+	0	0	0	0	0
Vacúolo					0	0	0	0		

Linfócitos CD8+, CD4+, CD11+ e B : número de células/mm2.

Complemento C3, IgA, IgG , IgM, macrófagos e células NK : intensidade detectada, - = ausente, += raro ou discreto, ++= ocasional ou moderado, +++= severo, frequente ou abundante.

Tabela 11
RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA

DIAGNÓSTICO : Neuropatia periférica de etiologia não determinada										
Caso n./ area(mm2)	CD8+	CD4+	CD11+	Cel B	C3	IgA	IgG	IgM	macro- fagos	NK
16 / 44										
Interstício	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Intra-fibra	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Perivascular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacúolo					0	0	0	0		

Linfócitos CD8+, CD4+, CD11+ e B : número de células/mm2.

Complemento C3, IgA, IgG , IgM, macrófagos e células NK : intensidade detectada, - = ausente, += raro ou discreto, ++= ocasional ou moderado, +++= severo, frequente e ou abundante.

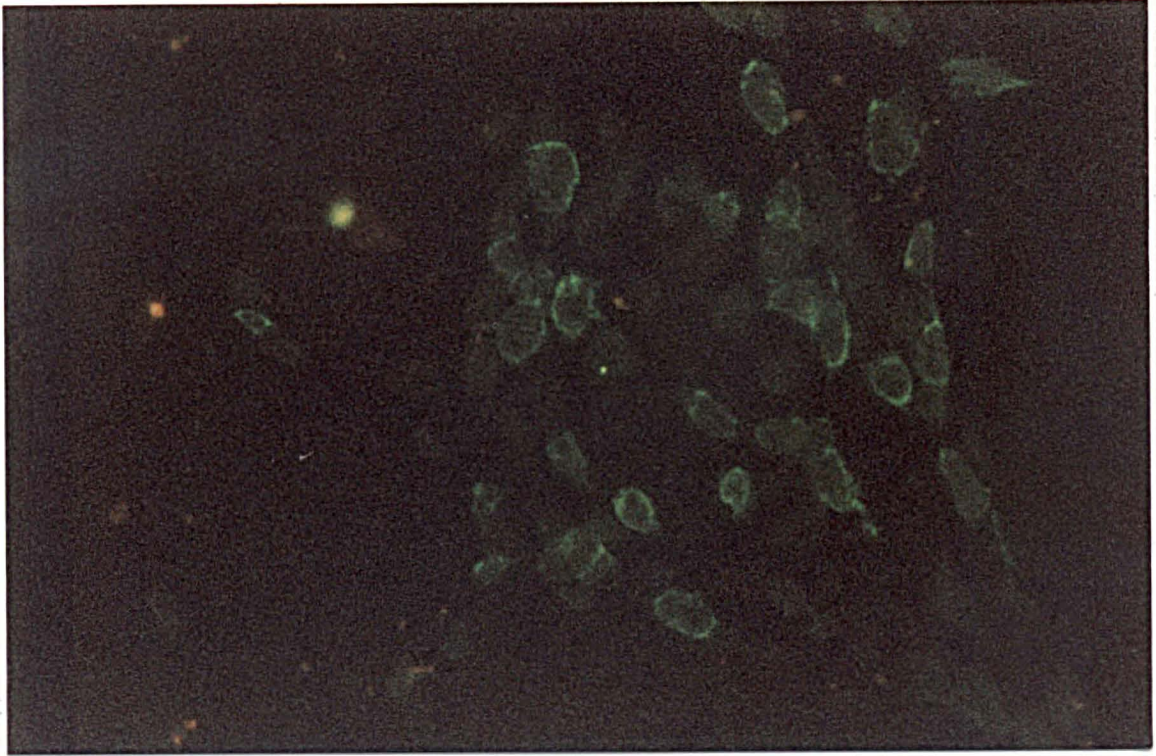


Figura 17 -Inúmeros linfócitos CD8+ invadindo fibra necrótica e no interstício.
Imunofluorescência para CD8+, 1740x..
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática - Caso 4)

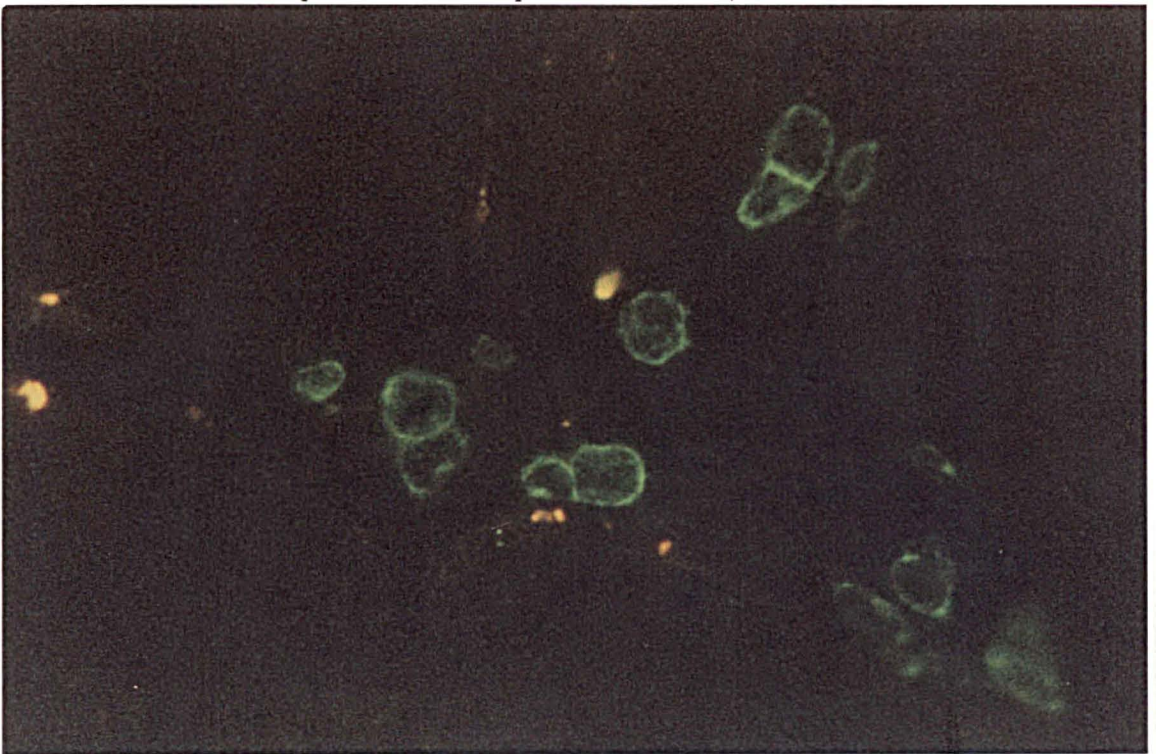


Figura 18 -Raros linfócitos CD8+ invadindo fibras não necróticas e no interstício.
Imunofluorescência para CD8+, 1740x..
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática- Caso 4).

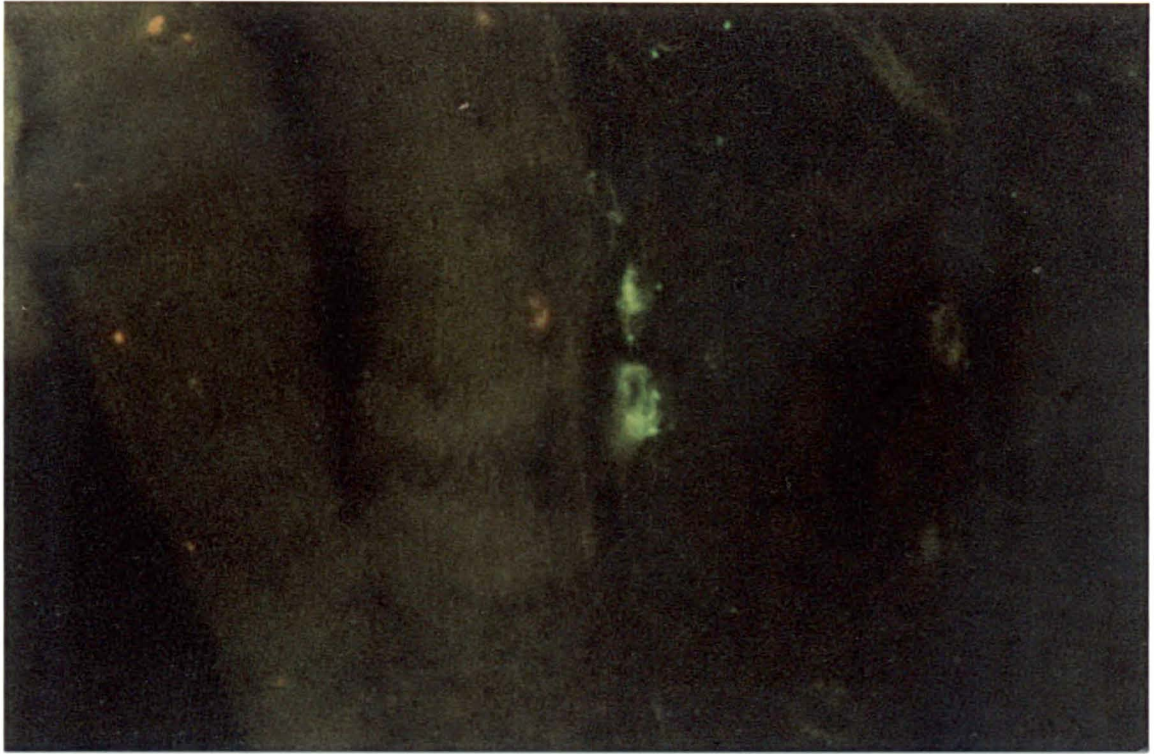


Figura 19- Linfócitos CD4+ (raros) entre fibras musculares em corte longitudinal.
Imunofluorescência para CD4+, 1740x.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática- Caso 3).

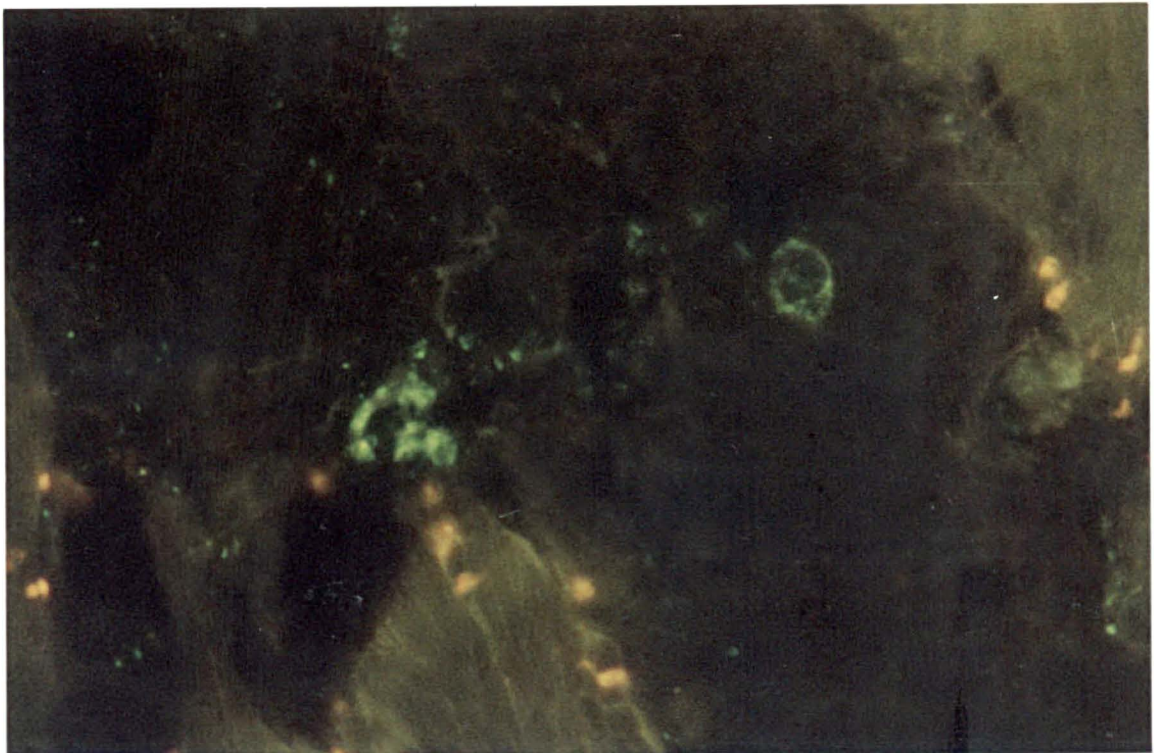


Figura 20 - Linfócitos CD4+ invadindo fibras e no interstício.
Imunofluorescência para CD4+, 1740x.
(Miosite por corpos de inclusão citoplasmática. Caso 3)

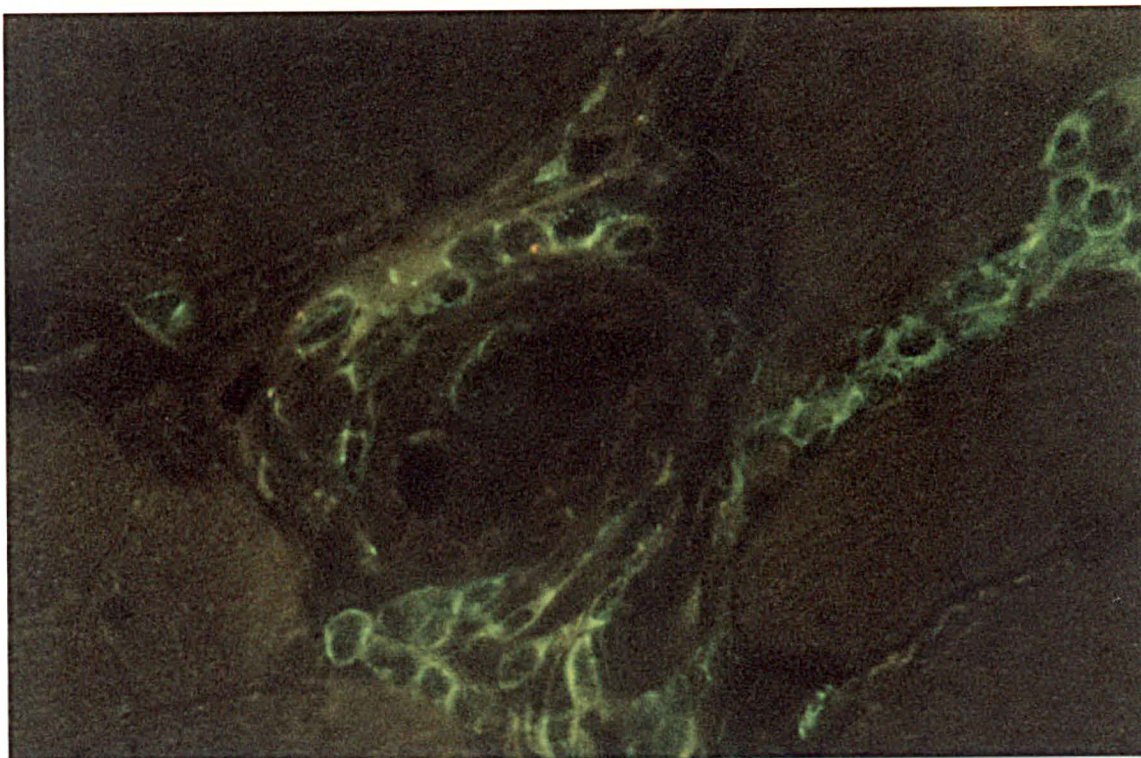


Figura 21 - Linfócitos CD11+ invadindo fibra não necrótica e no interstício.
Imunofluorescência para CD11+, 1740.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Caso 3)

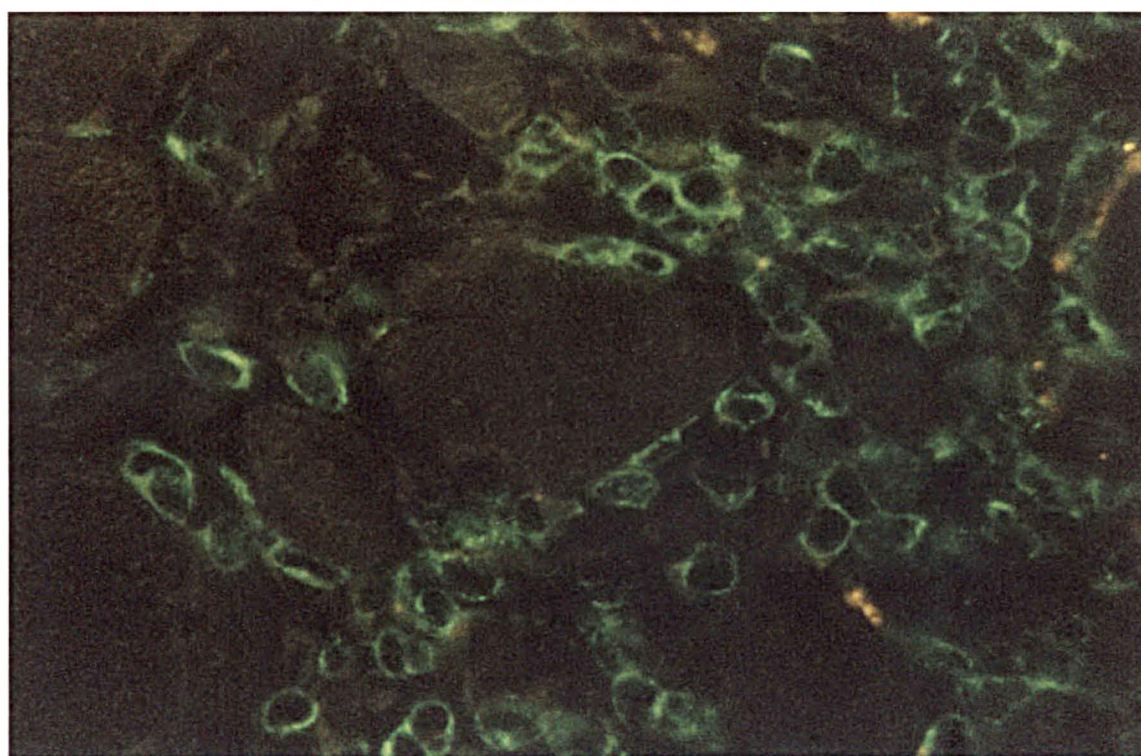


Figura 22- Inúmeros Linfócitos CD11+ no interstício e invadindo fibras.
Imunofluorescência CD11+, 1740.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Caso 3).

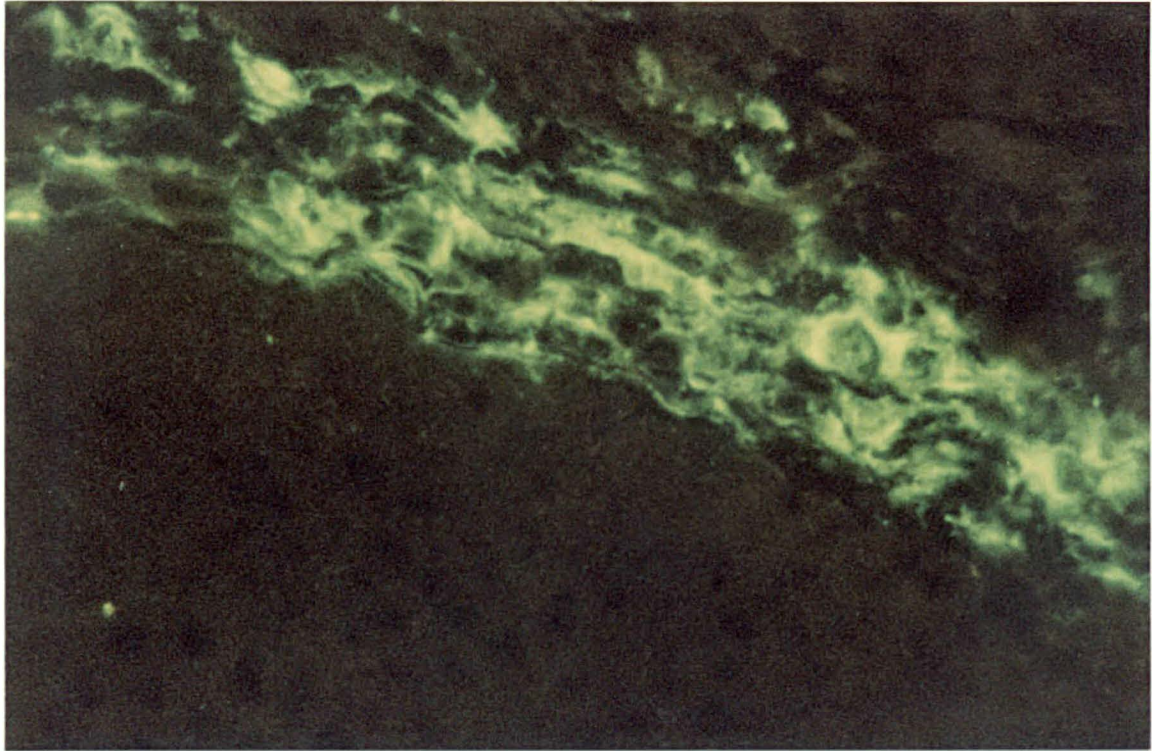


Figura 23 - Inúmeros macrófagos no interstício.
Imunofluorescência para macrófagos, 1740.
(Atrofia muscular espinhal juvenil. Caso 7).

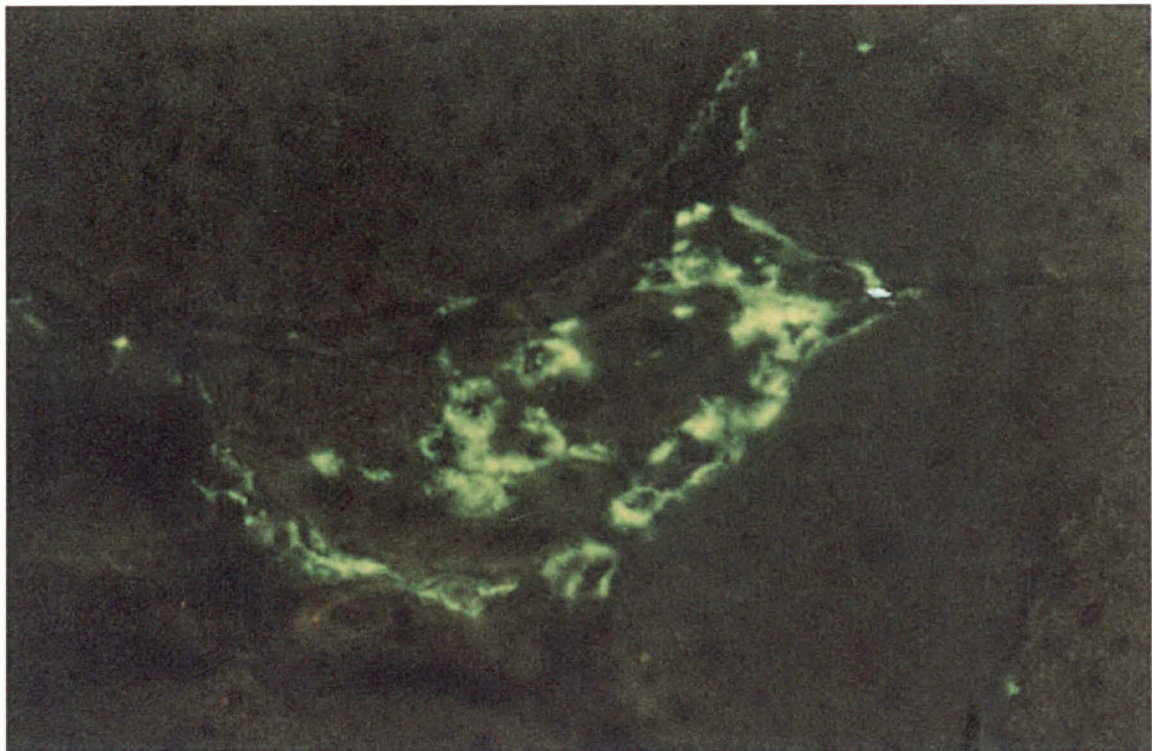


Figura 24- Macrófagos invadindo fibras e no interstício.
Imunofluorescência para macrófagos, 1740x.
(Atrofia muscular espinhal juvenil. Caso 7)

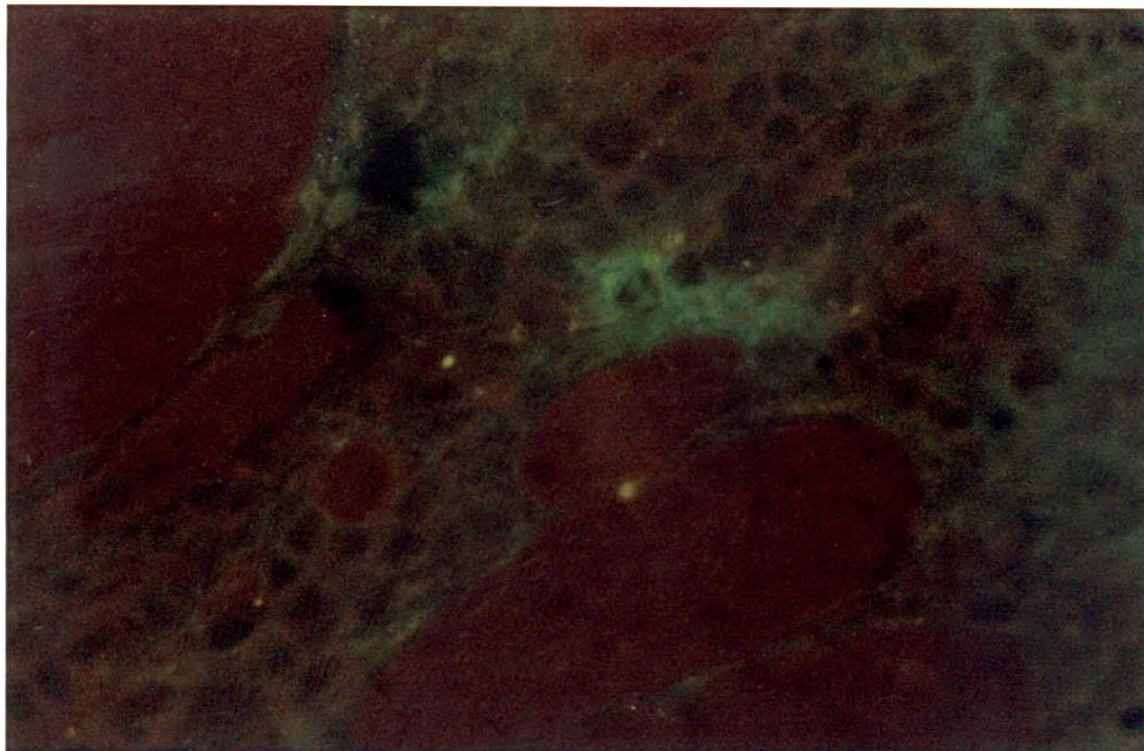


Figura 25- Deposição discreta de IgA no interstício e ao redor de células.
Imunofluorescência para IgA, 1740x.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Caso 4).

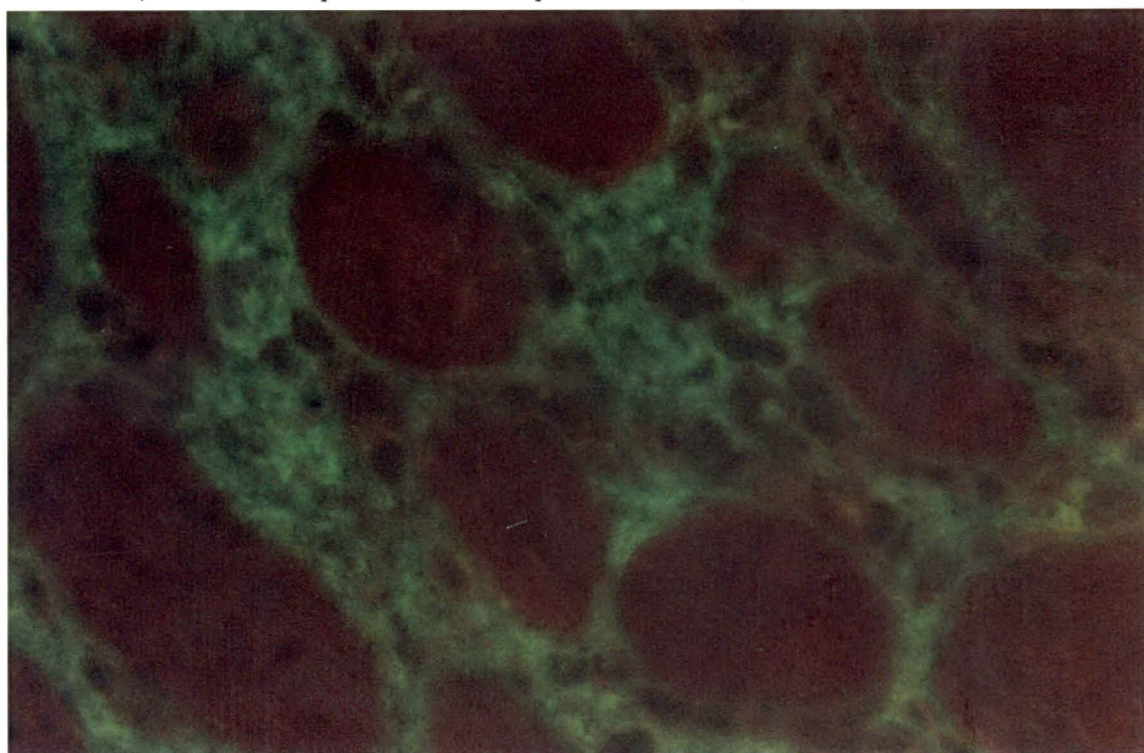


Figura 26- Intensa deposição de IgA no interstício e nas células.
Imunofluorescência para IgA, 1740x.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Caso 4).

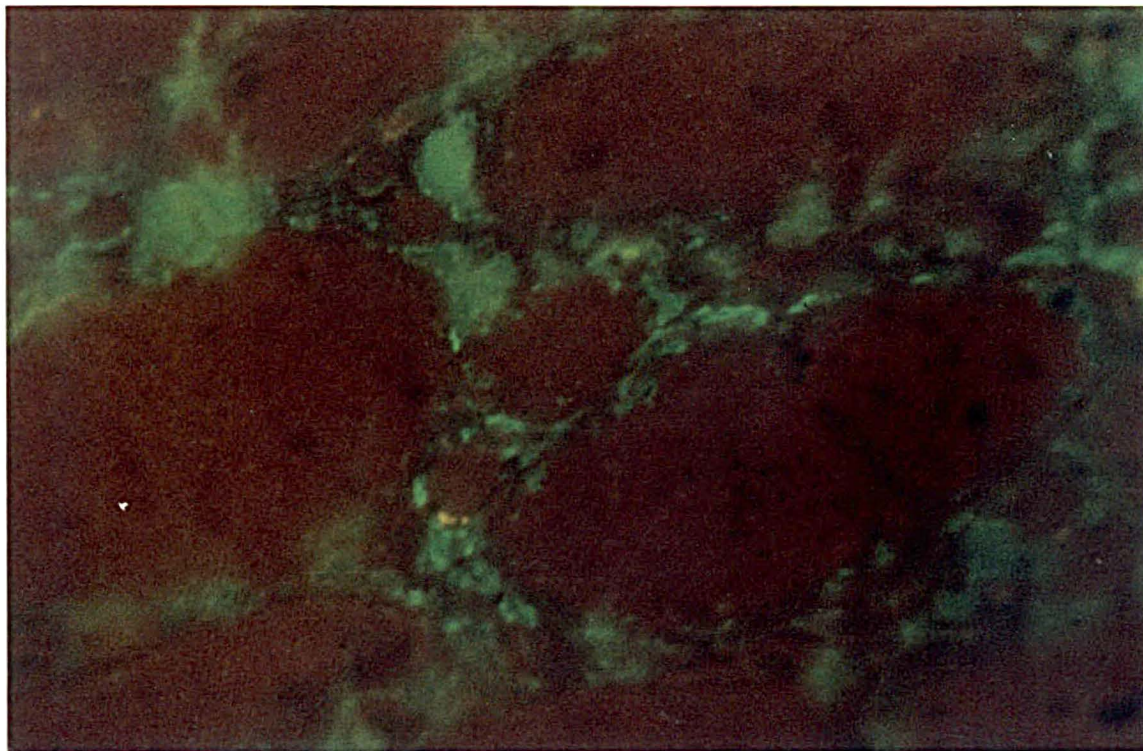


Figura 27- Deposição de IgG nas células e no interstício.
Imunofluorescência para IgG, 696x.
(Atrofia muscular espinhal juvenil. Caso 9).

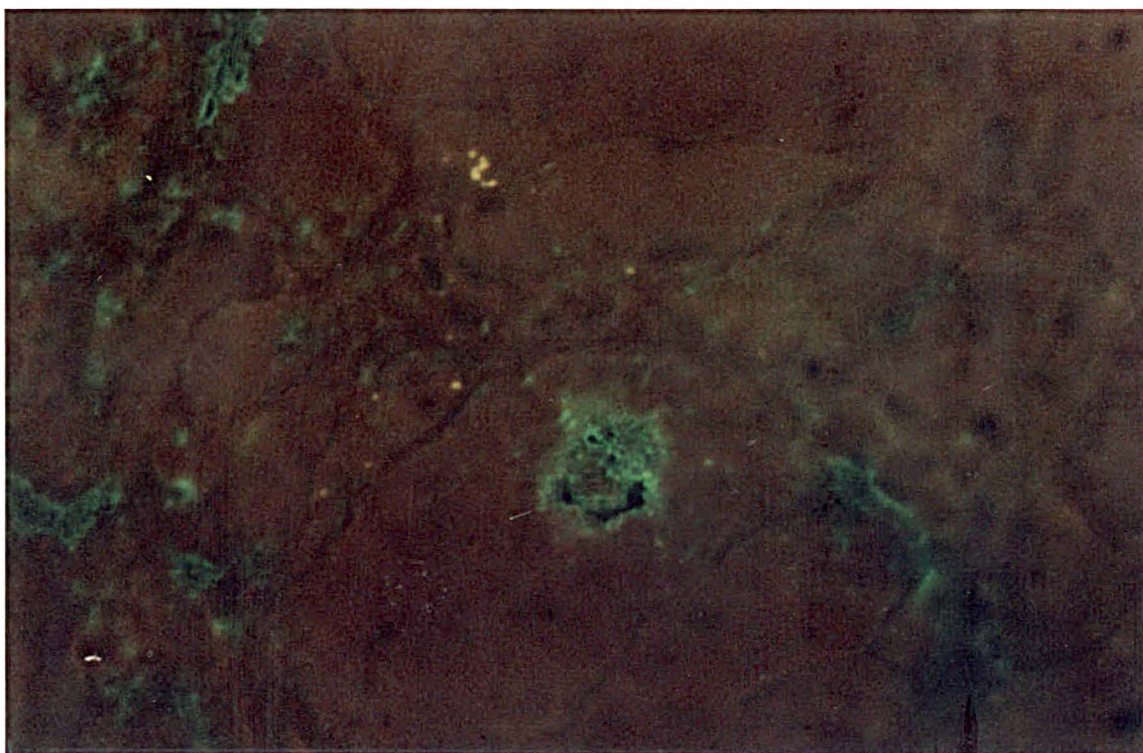


Figura 28- Deposição de IgG no vacúolo e no interstício.
Imunofluorescência para IgG, 696x.
(Atrofia muscular espinhal juvenil. Caso 9).

Nos casos 1, 2, 3 e 4, que correspondem aos casos de miosite por corpos de inclusão citoplasmática, o processo inflamatório predominante foi no interstício sendo menos marcante nas intra-fibras e espaço perivascular. Neste casos, houve um predomínio dos linfócitos CD8+ com média geral de 17,71 células por mm² no interstício, 3,63 e nas fibras e 0,19 nas áreas perivasculares. A presença de células CD4+ também foram predominantes nestes mesmos casos, sendo que no interstício o índice foi 4,51 células por mm², 0,51 e intra-fibras e 0,01 nos espaços perivasculares. Também as células B foram observadas raramente, tendo um índice de 0,93 por mm² no interstício e não foram vistas nas fibras e perivascular (Tabela 12)

Tabela 12
Análise Quantitativa Global de Células por Imunofluorescência
Média geral de células por doença (mm²)

Tipos de linfócitos	CD8+			CD4+			CD11+			B		
Doença	Inters-tício	Intra-fibra	Peri-vasc.	Inters-tício	Intra-fibra	Peri-vasc.	Inters-tício	Intra-fibra	Peri-vasc.	Inters-tício	Intra-fibra	Peri-vasc.
Miosite c/corpos de inclusão	17.71	3.63	0.19	4.51	0.51	0.01	46.87	17.55	0.45	0.93	0.00	0.00
Atrofia espinhal juvenil	1.31	0.13	0.00	0.64	0.06	0.00	3.14	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00
Miopatia distal	0.28	0.10	0.01	0.00	0.00	0.00	1.00	0.08	0.00	0.15	0.00	0.00
Distrofia de cinturas	2.16	0.22	0.07	1.05	0.75	0.01	0.32	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Polineurite	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Nas outras patologias observaram-se índices de células inflamatórias menores que os encontrados na miosite de corpos de inclusão, porém persistindo o predomínio de células CD8+, praticamente ausência de células B e na neuropatia periférica não foi encontrado nenhum tipo de célula (Tabela 12).

Existiam macrófagos em grande proporção na miosite com corpos de inclusão citoplasmática, miopatias distais, e um dos casos de distrofia muscular de cinturas estavam localizados na maioria dos casos no interstício, em torno de fibras necróticas, ou perivascular, enquanto que nas atrofias espinhais e no outro caso de distrofia muscular de cinturas foi observado mais no interstício. Estiveram ausentes na neuropatia periférica. As células exterminadoras naturais foram observadas no interstício da maioria dos casos de miosite por corpos de inclusão e mais raramente nos casos de atrofia espinhal, miopatia distal e distrofia muscular de cinturas. (Tabela 7, 8 9, 10).

Tabela 13
RELAÇÃO DOS LINFÓCITOS CD8+/CD4+

DOENÇA	INTERSTÍCIO	INTRA-FIBRA	PERIVASCULAR
			R
Miosite c/corpos de inclusão	3.9:1	7.1:1	19:1
Atrofia espinhal juvenil	2:1	2.2:1	0:0
Miopatia distal	1:0	1:0	1:0
Distrofia muscular de cinturas	2:1	1:3.4	7:1
Polineuropatia	0:0	0:0	0:0

A relação de células de CD8+/CD4+ foi maior na região perivascular e em torno de fibras necróticas que no interstício das fibras nos casos de miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Nas demais entidades patológicas, a relação de células CD8+/CD4+ foi maior nas regiões perivascular e interstício nas distrofias musculares de cinturas.

Tabela 14
Deposição de Imunoglobulinas e Complemento (C3)

	Miosite c/corpos inclusão	Atrofia espinhal juvenil	Miopatia Distal	Distrofia muscular de Cinturas	Polineurite
Num. casos	4	6	3	2	1
C3					
Interstício	0	1	1	0	0
Intra-fibra	2	2	0	0	0
Perivascular	0	3	1	1	0
Vacúolo	1	0	0	0	0
IgA					
Interstício	2	1	1	0	0
Intra-fibra	2	1	0	0	0
Perivascular	1	2	1	0	0
Vacúolo	1	1	0	0	0
IgG					
Interstício	0	1	1	0	0
Intra-fibra	3	2	1	0	0
Perivascular	0	3	2	0	0
Vacúolo	1	0	1	0	0
IgM					
Interstício	1	3	0	0	0
Intra-fibra	1	0	0	1	0
Perivascular	1	3	1	0	0
Vacúolo	0	0	1	0	0

(Número de casos positivos)

A presença de C3 e imunoglobulinas foi observada principalmente em miosite com corpos de inclusão citoplasmática e atrofia espinhal juvenil, sendo menor nas miopatias distais. Não foi observado em polineurite e distrofia muscular de cinturas pélvicas e escapulares. Apesar do pequeno número de pacientes estudados por patologia, notou-se maior intensidade de imunoglobulinas e C3 nos pacientes com miosite por corpos de inclusão citoplasmática (tabela 14).

6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Como foi proposto no material e métodos, na microscopia eletrônica estávamos procurando analisar somente os vacúolos e detectar outras estruturas celulares, os filamentos típicos descritos na miosite por corpos de inclusão citoplasmática. Assim, abaixo descrevemos somente os dados positivos encontrados, conforme o tipo de doença (Figuras 23, 24, 25, 26, 27 e 28).

MIOSITE COM CORPOS DE INCLUSÃO CITOPLASMÁTICA

Caso 1 - Muitos enrodilhados de membranas e processos degenerativos no citoplasma, mas não foram encontrados no material examinado filamentos em citoplasma e núcleo.

Caso 2 - Processos degenerativos de membranas.

Caso 3 - Filamentos em vacúolos medindo 14-18 nm na região subsarcolemal e filamentos dispersos no citoplasma entre corpos densos, figuras mielínicas e enrodilhados de membranas e grânulos de glicogênio.

Caso 4 - Vacúolos com filamentos medindo 14-18 nm na região subsarcolemal, parcialmente rodeado por miofibrilas. Entre as miofibrilas, presença de formação delimitada em parte pelas mesmas e em parte por enrodilhados de membranas contendo filamentos no seu interior. No citoplasma, vacúolos com filamentos entre enrodilhados de membranas e processos de degenerativos de membranas. Núcleo sem invaginação, porém contendo filamentos dispersos.

ATROFIA MUSCULAR ESPINHAL JUVENIL

Caso 5 - Diversos núcleos com filamentos e na região subsarcolemal a presença de um vacúolo contendo filamentos e membranas parcialmente degeneradas, próximo a miofibrilas.

Caso 6 - Núcleo com filamentos. Filamentos dispersos no citoplasma entre os enrodilhados de membranas e produtos da degeneração do citoplasma dentro de vacúolos.

Caso 7 - Enrodilhado de membranas. Não foram vistos filamentos em citoplasma e núcleo.

Caso 8 - Ausência de anormalidade.

Caso 9 - Ausência de anormalidade.

Caso 10 - Presença de enrodilhados de membranas, figuras mielínicas e corpos densos.

MIOPATIAS DISTAIS

Caso 11 - Enrodilhados de membranas, corpos densos e estruturas mielóides. Ausência de filamentos intranucleares ou intracitoplasmáticos

Caso 12 - Na região subsarcolemal, um vacúolo com filamentos e membranas enrodilhadas. Núcleo com invaginações e apresentando no seu interior filamentos. Massas de filamentos dispersos no citoplasma.

Caso 13 - Enrodilhados de membranas e figuras mielínicas dispersas no citoplasma, sem filamentos.

DISTROFIA MUSCULAR DE CINTURAS PÉLVICA E ESCAPULAR

Caso 14 - Na região subsarcolemal, vacúolos com filamentos no interior e, filamentos dispersos no citoplasma entre os produtos autofágicos e raros núcleos com filamentos.

Caso 15 - Na região subsarcolemal, vacúolos com filamentos parcialmente rodeados por miofibrilas. No citoplasma, a presença de filamentos dispersos entre estruturas mielóides. Raros núcleos, com pequena quantidade de filamentos intranucleares

NEUROPATIA PERIFÉRICA

Caso 16 - Filamentos na região subsarcolemal, em núcleo e disperso no citoplasma, entre enrodilhados de membranas e grandes estruturas mielóides.

Como os filamentos com diâmetro de 14 a 18 nm são muito importantes no diagnóstico e interpretação patogênica, na tabela 15 relacionamos os locais onde os mesmos foram encontrados.

Tabela 15
**LOCALIZAÇÃO DOS FILAMENTOS NA
 MICROSCOPIA ELETRÔNICA**

CASO NÚMERO	NÚCLEO	DISPERSO NO CITOPLASMA	SUB- SARCOLEMAL
1	NÃO	NÃO	NÃO
2	NÃO	NÃO	NÃO
3	NÃO	SIM	SIM
4	SIM	SIM	SIM
5	SIM	NÃO	SIM
6	SIM	SIM	NÃO
7	NÃO	NÃO	NÃO
8	NÃO	NÃO	NÃO
9	NÃO	SIM	SIM
10	NÃO	NÃO	NÃO
11	NÃO	NÃO	NÃO
12	SIM	SIM	SIM
13	NÃO	NÃO	NÃO
14	SIM	SIM	SIM
15	SIM	SIM	SIM
16	SIM	SIM	SIM

NÃO: Ausencia de filamentos; SIM: Presença de filamentos.



Figura 29. Presença de coleção fibrilar entre miofibrilas e corpos mielínicos entre os filamentos.
(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Caso 4).
Aumento 24,600 x.
Fi= filamentos
Cm= Corpos mielínicos
Mio= Miofibrilas

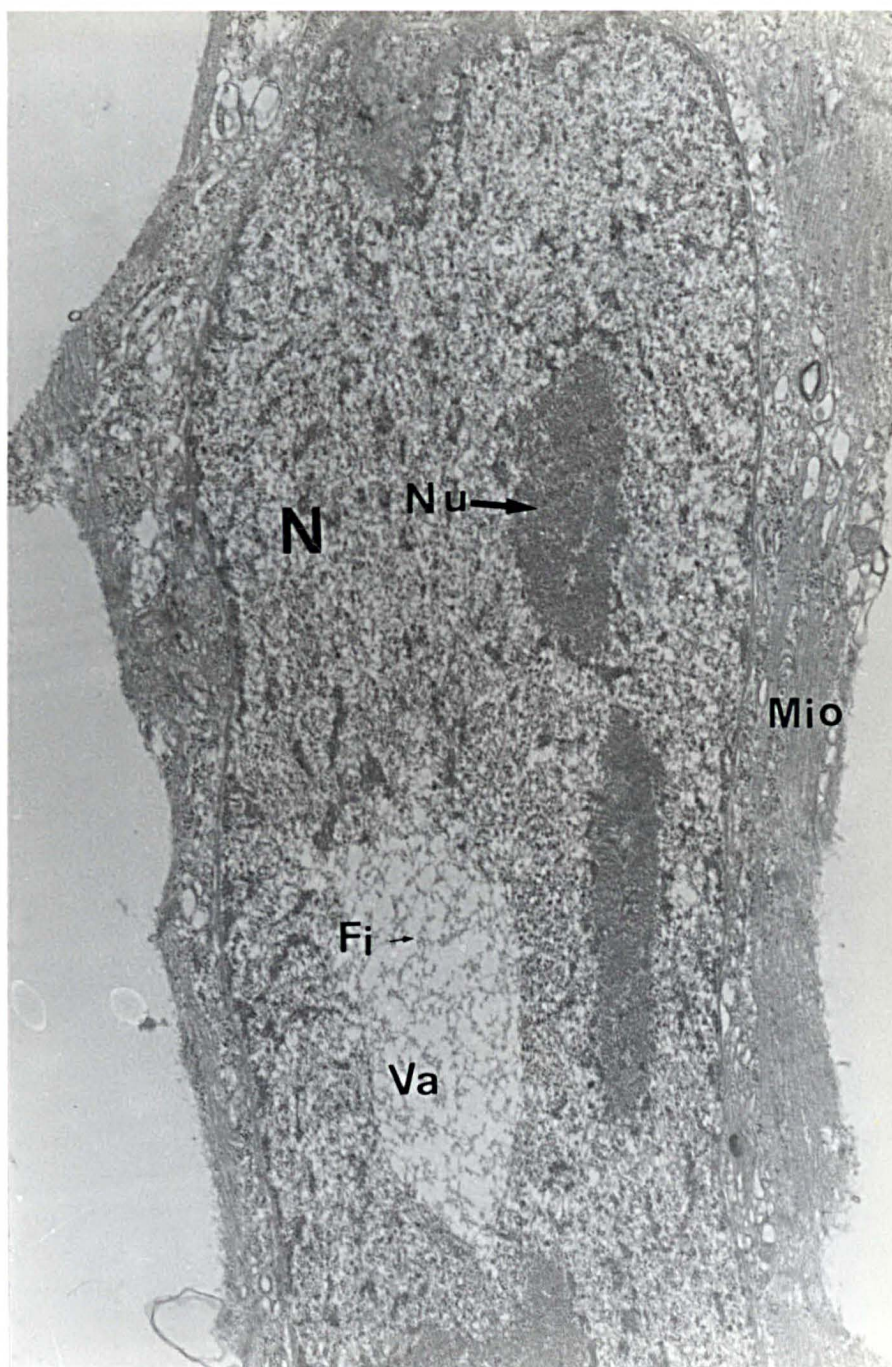


Figura 30. Núcleo com vacúolo sem membranas. Apresentando estruturas fibrilares em seu interior. Nucleolo evidente.
 (Miosite com corpos de inclusão citoplasmática. Caso4)
 Aumento 24,600 x
 N= núcleo
 Nu= nucleolo
 Fi=filamentos
 Mn= membrana nuclear
 Va=Vacúolo
 Mio=miofibrilas

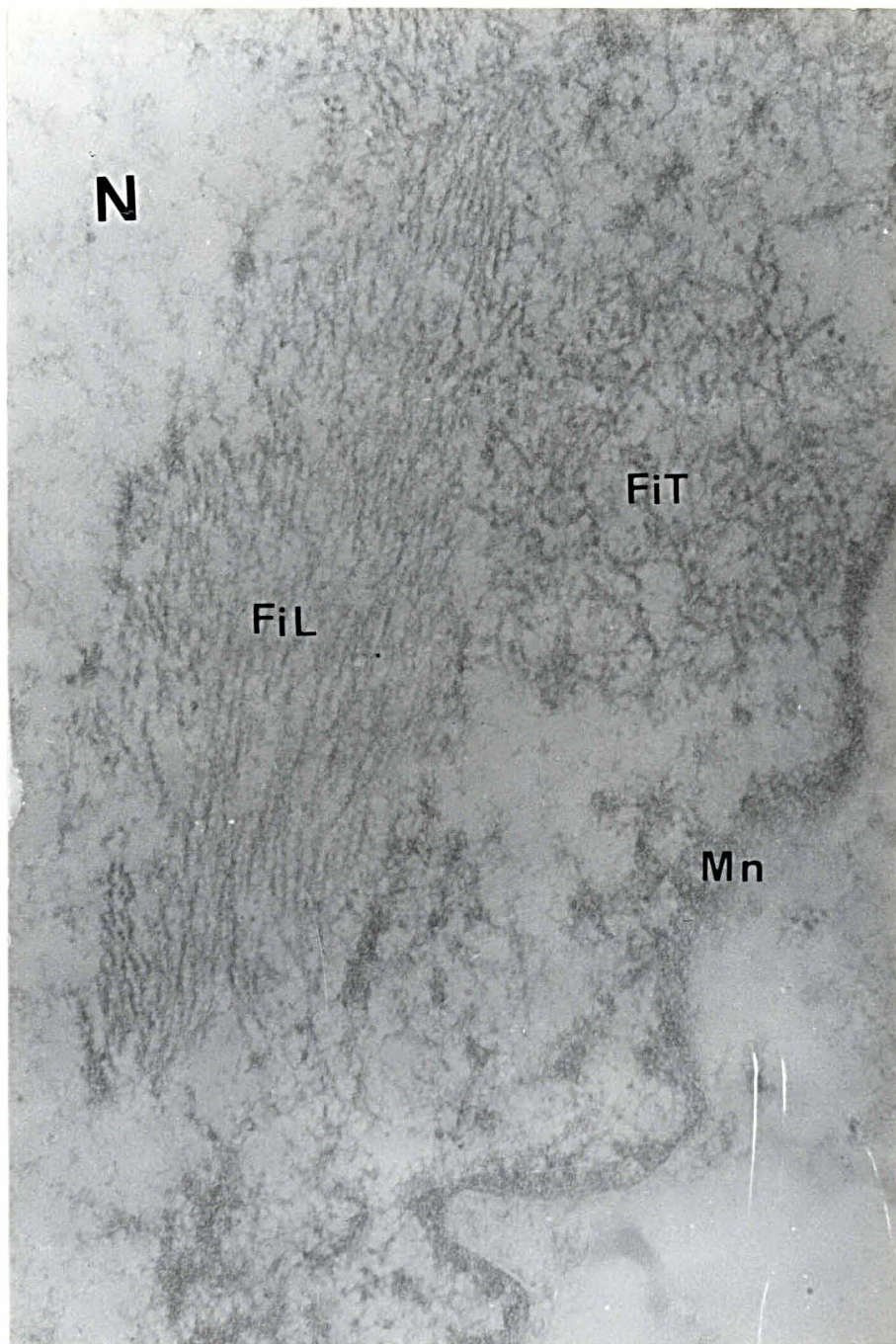


Figura 31. Visão parcial de um núcleo e membrana nuclear com filamentos em corte transversal e longitudinal.

Aumento 60.100 x

(Miopatia distal. Caso 12)

N=núcleo

Mn=membrana nuclear

FiL= filamentos longitudinais

FiT=filamentos transversais

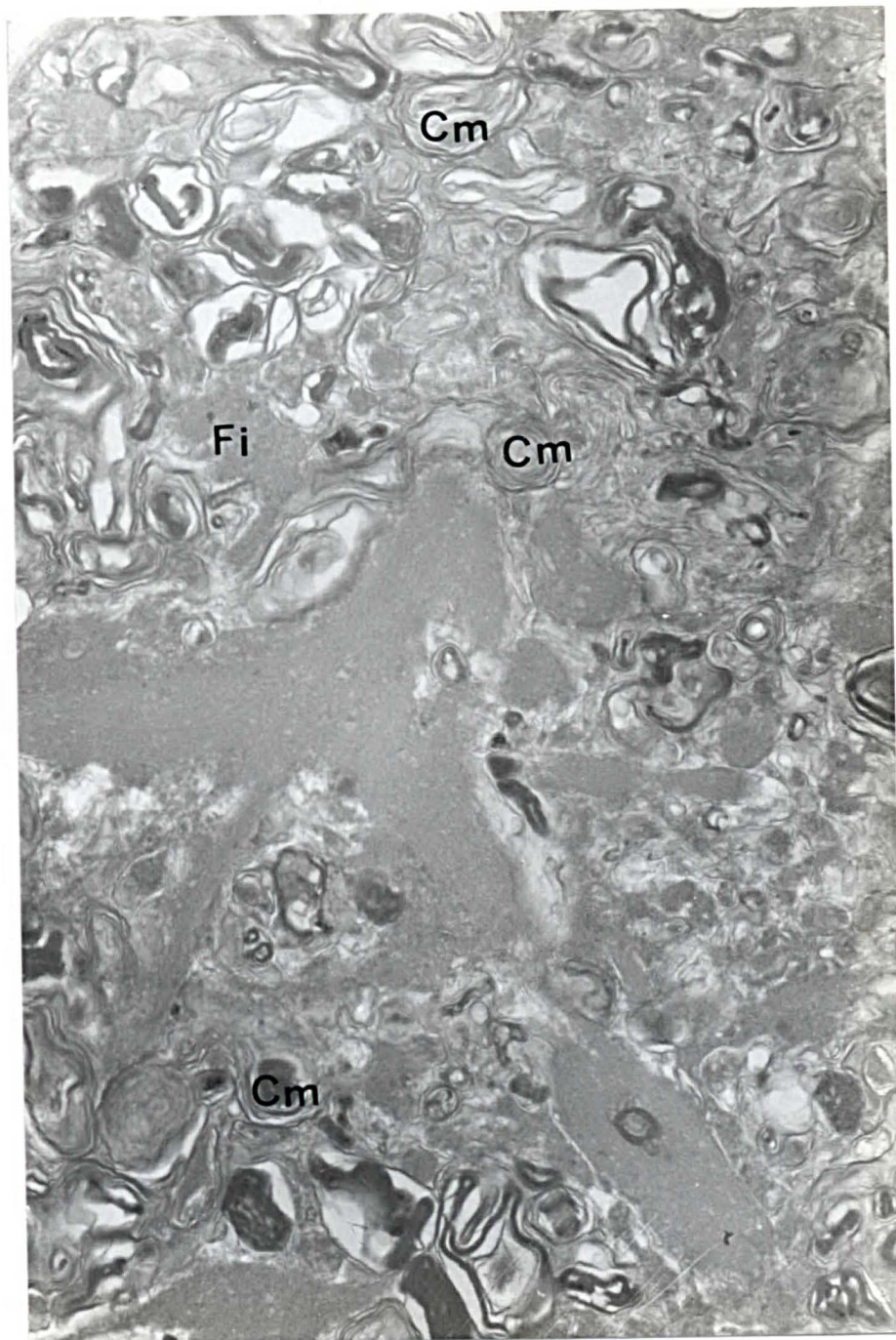


Figura 32. Grande número de corpos mielínicos, elemento frequente nos vacúolos autofágicos. Filamentos finos dispersos entre os Corpos mielínicos. (Atrofia muscular espinhal juvenil. Caso 6).
Aumento 16,410 x.
Cm= corpos mielínicos Fi=filamentos

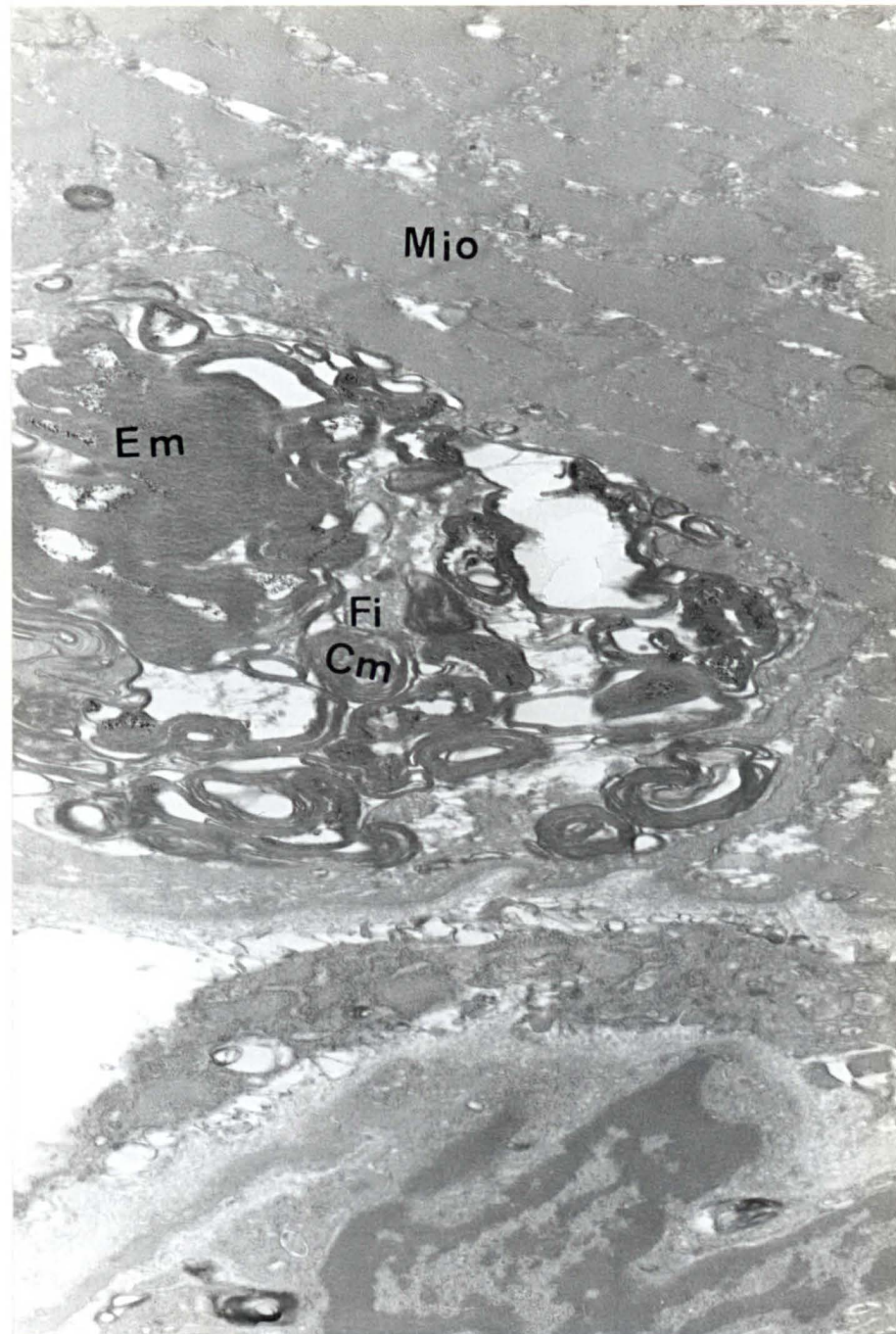


Figura 33. Vacúolo com enrodilhados de membranas, corpos mielínicos e estruturas filamentosas.

(Miosite com corpos de inclusão citoplasmática . Caso 3)

Aumento 14,600x.

Cm= corpos mielínicos

Fi= filamentos

Em= enrodilhados de membranas

Mio= miofibrilas.

COMENTÁRIOS

CORPOS DE INCLUSÃO CITOPLASMÁTICA

Desde a descrição inicial da miosite por corpos de inclusão citoplasmática por Yunis & Samaha 1971, vários relatos da literatura têm sido descritos, associados com aspectos clínicos diversos, sendo realizadas pesquisas afim de identificar melhor as estruturas do interior dos vacúolos e procurar novos fatores etiopatogênicos para a doença [YUNIS & SAMAHA, 1971].

A presença dos corpos de inclusões citoplasmáticas com filamentos intracitoplasmáticos e intranucleares permanece ainda sem uma etiologia definida. A hipótese inicial foi a de Chou, que sugeriu uma etiologia viral para as inclusões filamentosas, por se assemelharem aos filamentos da nucleocapside do paramixovírus e do mixovírus, bem como pela presença de imunofluorescência positiva para o vírus da caxumba [CHOU, 1967; CHOU, 1968; CHOU, 1986]. No entanto, a maioria das tentativas de cultura de vírus, inoculação em animais e imunofluorescência de diversos pacientes foram negativas [CARPENTER & COL., 1978; MIKOL & COL., 1982; YUNIS & SAMAHA, 1971], sendo que apenas em um caso foi isolado o adenovírus tipo 2 [MIKOL & COL., 1982]. Os autores sugeriam que o nucleocapside do vírus não representa os filamentos característicos da MCIC, mas que o vírus pode residir nas células e não produzir infecção clássica, mas sim modificar algumas estruturas proteicas específicas da célula ou induzir síntese anormal dos componentes celulares [MIKOL, 1986]. Porém foi demonstrado através de imunofluorescência para vírus da caxumba, que em pacientes com MCIC e outras miopatias a imunolocalização do vírus pode ocorrer por ligação inespecífica de IgG ao material membranoso, ao redor dos vacúolos marginados [NISHINO & COL., 1989]. Existe também o relato de um caso de paraplegia espástica tropical, que é causada pelo vírus HTLV-1, que apresentava estruturas na biópsia idênticas à MCIC [BHAGAVATI & COL., 1988; SOWA, 1992].

Os estudos em biópsias de várias doenças neuromusculares incluindo polimiosite, dermatomiosite e MCIC, utilizando técnicas com o vermelho congo alcalino e luz polarizada, demonstraram a presença de material com birefringência idêntica a material amilóide nos casos com vacúolos com corpos de inclusão citoplasmática. A birefringência foi demonstrada nos vacúolos, sendo raramente visto nas regiões peri e intranucleares das fibras musculares. A localização do

amilóide intracelular sugere que o mesmo seja sintetizado dentro da célula, ajudando a diferenciar da amiloidose sistêmica. A natureza dos filamentos ainda permanece desconhecida, porém a identificação do amilóide dentro da célula muscular aumenta a possibilidade do mesmo interferir nos processos digestivos da fibra muscular [MENDELL & COL., 1991]. Também foi demonstrado com técnicas de imunofluorescência para ubiquitina, que o material é um beta amilóide no interior dos vacúolos e livre no citoplasma. A ubiquitina é uma proteína intracelular presente nos eucariócitos e responsável pela quebra de proteínas anormais, tendo uma função na reparação do DNA e modificação da superfície dos receptores das células. Ela também é observada nas placas senis da doença de Alzheimer, cérebro de pacientes com síndrome de Down, amiloidose cerebral hereditária e em vacúolos de pacientes com distrofia oculofaringéia [ASKANAS & COL., 1991; ASKANAS & COL., 1992a; ASKANAS & COL., 1992b; SERDAROGLU & COL., 1992].

Recentemente, foi demonstrada no interior dos vacúolos de pacientes com MCIC, a presença de alfa1-antiquimiotripsina (alfa-1-AQT), que é um inibidor da protease sérica associada aos episódios de inflamação e tem elevação importante após a cirurgia, estando relacionada à quebra do tecido conjuntivo e inibição da atividade dos exterminadores naturais. Talvez esta seja a explicação do infiltrado inflamatório visto nas biópsias musculares de pacientes com MCIC [BILAK & COL., 1993].

A frequência das MCIC nos serviços de doenças neuromusculares tem mostrado uma variação de 0,4% a 1,3% nas biópsias realizadas [CARPENTER & COL., 1978; DANON & COL., 1982; MHIRI & GHERARDI 1990] e entre 14 a 30% nas miopatias inflamatórias [CALABRESE & COL., 1987; CARPENTER & COL., 1978; CHOU 1986; DANON & COL., 1982; LOTZ & COL., 1989; MHIRI & GHERARDI, 1990; RINGEL & COL., 1987;]. No nosso material de estudo, que compreende as biópsias realizados no Serviço de Doenças Neuromusculares do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, encontramos uma incidência de corpos de inclusão citoplasmática de 1,2%, sendo que entre as miopatias inflamatórias foi de 12,3%, próximo aos dos autores acima.

Com o correr dos anos, foram sendo descritos corpos de inclusão citoplasmáticos que diferiam da forma inicial de polimiosite crônica descrita por Yunis e Samaha [YUNIS & SAMAHA, 1971], em casos com formas clínicas, laboratoriais, eletroneuromiográficas e anatomopatológicas, que sugeriam formas de atrofia muscular espinhais [FUKUHARA & COL., 1980; SERRATRICE & COL., 1989], neuropatia periférica [MHIRI & GHERARDI, 1990], distrofia muscular de cinturas poupando quadriceps [MASSA & COL., 1991], distrofia muscular oculofaringéia [COQUET & COL., 1990; FUKURAHARA & COL., 1982; JAMES & COL., 1992]; miopatia de início na adolescência [TOMÉ & COL., 1993] e miopatia distal [EDSTROM, 1975; EDSTROM & COL., 1980; KUMAMOTO & COL., 1982; MARKSBERY & COL., 1977; MARTIN & COL., 1982; MATSUBARA & TANABE, 1982; NONAKA & COL., 1985; SUNOHARA & COL., 1989]. Tendo em vista as observações acima, também

observamos na nossa cauística, além dos casos que preenchiam os critérios para miosite por corpos de inclusão, formas de atrofia muscular espinhal juvenil, miopatia distal semelhantes as citadas por Nonaka e Colaboradores [NONAKA & COL., 1981], distrofia muscular da forma de cinturas e neuropatia periférica [CALABRESE & COL., 1987; MHIRI & GHERARDI, 1990; NONAKA & COL., 1985].

ENZIMAS SÉRICAS

As enzimas musculares geralmente estão elevadas no sangue, nos pacientes com doenças musculares, tendo origem no tecido muscular [ENGEL, 1986b] e são liberadas durante os processos patológicos, quando as membranas das fibras são rompidas ou pela necrose [MUNSAT & COL, 1973; PENNINGTON, 1981]. Embora todas as enzimas tenham concentrações semelhantes na fibra muscular, quando são liberadas no plasma, têm processo de depuração diferente, determinando variações conforme o tipo de enzima [MUNSAT & COL, 1973; PENNINGTON, 1981]. Nas séries relatadas como miosite de corpos de inclusão citoplasmática (MCIC), existem casos com creatinoquinase normal [CARPENTER & COL., 1978; EISEN & COL, 1983; KETELSEN, 1987; LOTZ, & COL., 1989; MHIRI & GHERADI, 1990 RINGEL & COL, 1987; SERRATRICE 1989], elevação moderada (até 10 vezes do limite normal) [CALABRESE & COL ,1987 ; LOTZ, COL., 1989] e casos com elevações importantes [CARPENTER & COL., 1978; JULIEN & COL., 1982; KETELSEN, 1987; SAYERS & COL., 1992; SERRATRICE & COL., 1989].

Dos 16 casos, quatro mostraram níveis séricos normais. A creatinoquinase estava elevada em 11 pacientes, sendo que o caso 6 revelou aumento 10 vezes do valor normal. Nos quatro casos com enzimas normais (casos 3, 4, 5 e 15), um apresentava na biópsia muscular uma miopatia inflamatória. O caso 10, que mostrou uma biópsia muscular com padrão de desinervação, a creatinaquinase estava elevada três vezes acima do valor normal. A presença das enzimas séricas normais em biópsias musculares com padrão inflamatório, já é um fato comprovado na literatura, sendo verificada por diversos autores [LOTZ & COL., 1989; MHIRI & GHERARDI, 1990; SERRATRICE & COL., 1989, WERNECK, 1991], bem como a presença de enzimas séricos discretamente ou moderadamente elevados em casos de desinervação [EISEN & COL., 1983; FUKUHARA & COL., 1980; MHIRI & GHERARDI, 1990; SERRATRICE & COLS, 1989;]. A razão parece ser um defeito nas membranas das fibras musculares, cujo fator causal não é conhecido [MUNSAT & COL, 1973]. A elevação da aldolase, TGO, TGP e LDH raramente são relatos nos casos onde existem corpos de inclusão citoplasmática, sendo que poucos autores utilizam os cinco enzimas para avaliação nas doenças neuromusculares [SHAW & COL, 1967; WERNECK, 1991]. Nos nossos estudos, só encontramos as mesmas elevadas em quatro pacientes e bastante discretas quando comparadas com a creatinoquinase.

ELETROMIOGRAFIA

O padrão da eletromiografia encontrada nas miopatias inflamatórias mais comumente é constituído por potenciais de duração diminuídos, voltagem baixa, aumento do recrutamento, excesso de potenciais polifásicos curtos, com a presença eventual de fibrilações e ondas positivas, sendo também denominado padrão miopático [BUCHTHAL, 1977; WERNECK, 1988]. Este é o padrão eletromiográfico mais descrito na MCIC [CARPENTER, 1978; JULIEN & COL., 1982; JOY & COL., 1990; KETELSEN, 1987; LAZARO & COL., 1986; LINDENBERG & COL., 1991; MASSA & COL., 1991; MHIRI & GHERARDI, 1990; RIGGS & COL., 1984; RINGEL & COL., 1987; SAYERS & COL., 1993; SERRATRICE & COL., 1989;], podendo ser encontrados outros tipos de potenciais, onde existe aumento da duração, aumento da voltagem média, recrutamento reduzido, fibrilações e ondas positivas, chamados de neuropáticos [EISEN & COL., 1983; MHIRI & GHERARDI, 1990; RINGEL & COL., 1987; SAYERS & COL., 1992; SERRATRICE & COL., 1989]. Também foram relatadas eletromiografias nas MCIC com a combinação dos dois tipos, denominados mistos ou neuromiopáticos [CARPENTER, 1983; ENGEL, 1986 p.1423-1438; JOY & COL., 1990; JULIEN & COL., 1982; LINDENBERG & COL., 1991; MASSA & COL., 1991; MHIRI & GHERARDI, 1990; RINGEL & COL., 1987; SAYERS & COL., 1993; SERRATRICE & COL., 1989; SHIELDS & COL., 1989; VERMA & COL., 1991; WERNECK, 1991]. Além da presença de padrão miopático a presença de fenômeno miotônico foi relatada [JULIEN & COL., 1982]. O padrão mais controverso é o padrão misto, observado em grandes séries, como a de Lotz e Colaboradores, que observaram este padrão em 75% dos casos [LOTZ & COL., 1989].

O padrão miopático na eletromiografia foi observado em 6 dos nossos pacientes. Na nossa casuística, encontramos cinco casos que apresentavam padrão neuropático. Foram observados nos 16 casos, quatro pacientes que apresentavam o padrão misto ou neuromiopático.

A presença de um padrão eletromiográfico de miopatia, desinervação ou a combinação de ambos nos casos com MCIC, sugere uma heterogeneidade patogênica. Os casos com eletromiografia miopática se enquadram no grupo que contém reação inflamatória concomitante [DIMITRIU & NEWELL-EGGERT, 1990; KETELSEN, 1987;]. Os casos com eletromiografia de desinervação ou mista necessitam maiores explicações, pois patogenicamente inferem um processo de desinervação primária ou secundária da fibra muscular [EISEN & COL., 1983; LAZARO & COL., 1986; MHIRI & GHERARDI, 1990;]. Assim, alguns autores procuraram explicar estes tipos de potenciais, relacionando-os na biópsia muscular à presença de fibras atroficas angulares e pequenos grupos de fibras atroficas observados nas biópsias [UNCINE & COLS., 1987]. Quando existe necrose parcial da fibra muscular, a porção que ficou sem a terminação nervosa, reage fisiologicamente como desinervada, produzindo fibrilações e ondas positivas, e na histologia sendo representada por fibras anguladas atroficas na esterase e NADH-tetrazólio reductase, que também são encontradas nos processos neurogênicos [DESMEDET & BORENSTEIN, 1975]. Nos casos de

desinervações crônicas e de reinervação, existe brotamento das terminações nervosas, que irão inervar as fibras desinervadas, aumentando a área da unidade motora sobrevivente e proporcionando o aumento na duração dos potenciais musculares, induzindo alterações na estrutura histoquímica da fibra [DUBOWITZ, 1967; KARPATI & ENGEL, 1968; KUGELBERG & COL., 1970]. A literatura aponta casos de MCIC que apresentavam eletromiografia neurogênica, reconhecidos clinicamente e laboratorialmente como formas de atrofia espinhais [SERRATRICE & COL., 1989]. Estes achados, assim como de outros autores com eletromiografia desinervatórias e biópsias musculares com pouco processo inflamatório, nos possibilitam a pensar na idéia que muitos dos casos descritos como MCIC, poderiam, na verdade representarem casos de atrofia espinhais.

RELACÃO DOS CORPOS DE INCLUSÃO CITOPLASMÁTICA (CIC) COM CONDUÇÕES NERVOSAS

As conduções nervosas, latências distais e ondas F mostram-se geralmente normais nos pacientes com MCIC [CARPENTER & COL., 1978; LAZARO & COL., 1986; LOTZ & COL., 1989, MIKOL & COL., 1982]. Alguns autores relatam a presença de conduções nervosas, amplitudes dos potenciais motores e sensitivos reduzidas, [EISEN & COL., 1983]. Porém, na maioria dos casos que apresentavam alterações importantes nas conduções nervosas, havia associação com neuropatia periférica de várias etiologias, como etilismo, diabetes melitus e colagenoses [DIMITRIU & NEWELL-EGGERT, 1990; LOTZ & COL., 1989]. Em alguns pacientes com MCIC, que foram submetidos à biópsia de nervo, foi encontrada, redução do número de fibras mielínicas, mas foi considerado um achado inespecífico [CARPENTER & COL., 1978; EISEN & COL., 1983; RINGEL & COL., 1987]. Em somente um dos nossos casos, encontramos redução da velocidade de condução, que correspondia a um caso com neuropatia periférica, sendo os demais normais ou no limite inferior da normalidade.

BIÓPSIAS MUSCULARES

Os achados anatomopatológicos encontrados na miopatia inflamatória aguda são baseados na presença de necrose, fagocitose, reação inflamatória excessiva em relação à necrose, núcleos centrais, fibras em regeneração, fosfatase ácida aumentada nas fibras e interstício. Já na miopatia inflamatória crônica, além dos elementos acima, existem os elementos da miopatia crônica, como proliferação de tecido conjuntivo, atividade da fosfatase alcalina em fibras e no interstício [WERNECK, 1985]. O padrão histológico básico relatado nas MCIC é variável, porém a presença do vacúolo marginado é ponto fundamental [CALABRESE & COL., 1987; LOTZ &

COL., 1989]. Lotz e Colaboradores demonstram que em 88% dos seus casos havia importante infiltrado inflamatório endomisial e outras alterações compatíveis com miopatias inflamatórias [LOTZ & COL., 1989]. Esta reação inflamatória é mediada por fatores humorais, que agem na membrana externa da fibra muscular causando o acúmulo de linfócitos, que determinarão a invasão e a necrose da fibra muscular [ENGEL & ARAHATA, 1984]. As reações celulares não são específicas, podem aparecer nas distrofias musculares, como na de Duchenne, nas fâscio-escapulo-humeral e menos comumente ocorrem nas desinervações, como nas atrofias espinhais e neuropatias crônicas [ARAHATA & ENGEL, 1984; DUBOWITZ, 1985 p.82-128]. Werneck observou que nas doenças neuromusculares em geral, o infiltrado inflamatório difuso ocorre em 6.8% das biópsias e, em 8.7%, o infiltrado inflamatório é desproporcional à necrose, sugerindo que o processo patológico é mediado por células [WERNECK, 1991]. No entanto, foram sendo relatados casos de MCIC com infiltrado inflamatório muito pequeno e inclusive em boa parte dos mesmos não foi detectado reação celular [CARPENTER & COL., 1978; EISEN & COL., 1983; JULIEN, & COL., 1982; ; MHIRI & GHERARDI, 1990; MIKOL & COL, 1982; SERRATRICE & COL, 1989].

Em nossos casos observamos quatro com características de miopatia inflamatória (casos 1, 2, 3 e 4), enquanto que o infiltrado desproporcional à necrose esteve presente em seis (casos 1, 3, 8, 9, 12, 14).

Serratrice e Colaboradores demonstraram, em 3 de seus casos de MCIC, que as biópsias musculares mostravam apenas alterações para desinervação com agrupamentos, atrofia em pequenos grupos, raras células inflamatórias e seis outros casos, que também possuíam elementos para desinervação (fibras em alvos, atrofia em pequenos grupos) [SERRATRICE E COLS., 1989]. Outros autores também descrevem a presença de biópsias típicas de desinervação [EISEN & COL., 1983; MHIRI & GHERARDI, 1990]. Os casos 5 e 10 mostraram padrão típico de desinervação. Carpenter e Colaboradores acham que o moderado comprometimento neurogênico é originário do dano da fibra muscular, incluindo a atrofia de fibras em grupos e excessivo número de fibras angulares atróficas hipercontraídas nas enzimas oxidativas. Embora estes achados sejam encontrados nas desinervações, eles acreditam que a redução do número de fibras musculares pode resultar em angulação ou agrupamentos. Aham que se existem fibras angulares na MCIC, sendo estas o resultado da necrose na região das placas justificam também os agrupamentos encontrados nas miopatias isquêmicas experimentais onde há uma clara regeneração após a necrose, Eles admitem que a presença de agrupamentos nos seus pacientes seja de caráter "miopático" [CARPENTER & COL., 1978]. Deve-se, no entanto lembrar que, os nervos também são afetados durante a isquemia e portanto esta explicação não é válida, bem como também a explicação de agrupamento "miopático" que é inconsistente com os conhecimentos atuais. Eisen & Colaboradores, admitem que a atrofia de fibras em grupo e fibras angulares encontradas em seus casos, é também visto nas desinervações, mas não observados

agrupamentos. Fibras em segmentação encontradas também podem ser consequência da hipertrofia, sendo mais comum em doenças neurogênicas, bem como fibras em alvo [EISEN & COL, 1983].

Muitos achados na histologia de nossos pacientes apresentam caracteres para desinervação como fibras angulares atroficas em grande número nos casos 1, 5, 6, 7, 8, 9, 12 e 15 [CARPENTER & COL., 1978; DANON & COL., 1982; EISEN & COL., 1983; LAZARO & COL., 1986; LOTZ & COL., 1989; MIKOL & COL., 1982; RINGEL & COL., 1987], grandes aglomerados de fibras atroficas nos casos 2, 6, 9, 16 e pequenos aglomerados de fibras atroficas na grande maioria dos casos [CARPENTER & COL., 1978; DANON & COL., 1982; EISEN & COL., 1983; JULIEN & COL., 1982; LAZARO & COL., 1986; LOTZ & COL., 1989]. Nos casos 2 e 5 foi observado também presença de agrupamentos [MHIRI & GHERARDI, 1990; SERRATRICE & COL., 1989]. A possibilidade de existir um misto das alterações descritas acima, com elementos tanto para miopatias como para desinervação com predomínio para uma ou para outra foi por nos relatada observada em oito casos [CARPENTER & COL., 1978; EISEN & COL., 1983; LOTZ & COL., 1989; SERRATRICE & COL., 1989].

MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Após a identificação dos vacúolos marginados na microscopia óptica, a microscopia eletrônica se constitui num dos elementos fundamentais para estudar a ultraestrutura dos mesmos. Através da microscopia eletrônica, é que foi possível identificar os filamentos descritos no interior dos vacúolos, no citoplasma e nos núcleos das fibras. Yunis & Samaha e Chou, observaram inicialmente a presença de grandes agregados de filamentos ocorrendo no citoplasma e núcleo, Também associados a estas alterações, descreveram abundantes corpos membranosos contendo grânulos de glicogênio na membrana sarcolemal [CHOU & MADISON, 1968; YUNIS & SAMAHA, 1971]. Os filamentos chamaram tanto a atenção, que passaram a ser procurados nos casos de MCIC, sendo atualmente indispensáveis no diagnóstico, tendo em vista o grande número de descrições [ABARBANEL & COL, 1988; CALABRESE & COL, 1987; CARPENTER & COL, 1978; EISEN & COL., 1983; GUTMANN & 1985; HÜBNER & PONGRATZ, 1980; JULIEN & COL, 1982; KETELSEN & COL., 1987; LANE & COL., 1985; LOTZ & COL., 1989; MIKOL & COL., 1982; RINGEL & COL., 1987; SALAMA & COL., 1980; SERRATRICE & COL., 1989; YOOD & SMITH, 1985].

Os filamentos podem ser observados em cortes transversais e longitudinais, com medidas variáveis do diâmetro externo, variando de 14-23 nm [ABARBANEL & COL., 1988; CARPENTER & COL., 1978; CHOU & MIZUNO, 1986; DANON & COL., 1982; EISEN & COL., 1983; FUKUHARA & COL., 1980; HÜBNER & PONTGRATZ, 1980; JULIEN & COL, 1981; KETELSEN & COL, 1987; LANE & COL., 1985; LAZARO & COL, 1986; LINDBERG & COL., 1990; LOTZ & COL, 1989; MASSA & COL, 1991; MENDEL & COL., 1991; MHIRI & GHERARD 1990; MIKOL & COL., 1982; RINGEL & COL., 1987; SALAMA & COL., 1980; SERRATRICE & COL., 1989; VERMA & COL., 1991]. Alguns autores relatam a presença de diâmetros menores no núcleo que no citoplasma, variando de 4-6 nm [DANON & COL, 1982; JULIEN & COL., 1987; LOTZ & COL., 1989; RINGEL & COL., 1987; SALAMA &

COL., 1980]. O comprimento dos filamentos varia de 0,8 a 1,5 micra [MENDEL & COL., 1991; SALAMA & COL., 1980;], existindo alguns de até 2 a 3 micra [MIKOL & COL., 1982].

No citoplasma, os filamentos podem estar total ou parcialmente envolvidos por membranas [ABARBANEL & COL., 1988; CARPENTER & COL., 1978; JULIEN & COL., 1982; KETELSEN, 1987; LAZARO & COL., 1986], ou formando massas citoplasmáticas, que não podem ser distinguidas adequadamente dos corpos mielínóides, glicogênio e miofilamentos, podendo ainda estarem dispersos no citoplasma [CHOU, 1986; CARPENTER & COL., 1978; JULIEN & COL., 1982; LOTZ & COL., 1989]. Se alguns casos possuíam filamentos no citoplasma, vacúolos e núcleos, outros os apresentavam somente no citoplasma [CARPENTER & COL., 1978, CHOU, 1986; DANON & COL., 1982; KETELSEN, 1987; LAZARO & COL., 1986; LOTZ & COL., 1989; MHIRI & GHERARDI, 1990; SERRATRICE & COL., 1989] ou inclusive unicamente no núcleo [CHOU & MIZUNO, 1986]. No núcleo, eles podem rechaçar a cromatina para a periferia, estarem contidos em pseudo-inclusões formadas por invaginação do citoplasma no núcleo [CARPENTER & COL., 1978], ou liberados do núcleo para o citoplasma [KETELSEN, 1987; CHOU, 1986].

Além dos filamentos, foram descritas outras anormalidades no citoplasma e vacúolos, como enrodilados de membranas e corpos mielínicos [ABARBANEL & COL., 1988; BENKE, 1985; CHOU, 1986; DANON & COL., 1982; EISEN & COL., 1983; GUTMANN & COL., 1985; KETELSEN, 1987; LANE & COL., 1985; RINGEL & COL., 1987; YOOD & SMITH, 1985] que parecem corresponder aos grânulos basofílicos vistos na histoquímica [DANON & COL., 1982; LANE & COL., 1985; LAZARO & COL., 1986]. sendo associadas aos vacúolos autofágicos, sugerindo que fazem parte do sistema lisossomal [SEWRY, 1985]. Raros casos também foram descritos, onde existiam anormalidades nas mitocôndrias, com inclusões cristalóides [DANON & COL., 1982; KETELSEN, 1987].

Os casos 4, 12, 14, 15 e 16 apresentavam filamentos nucleares, dispersos no citoplasma e na região subsarcolemal. O caso 5 apresentava filamentos no núcleo e na região subsarcolemal, porém não livre no citoplasma. Os casos 3 e 9 apresentavam filamentos somente no citoplasma e região subsarcolemal porém não no núcleo. O caso 6 tinha filamentos no núcleo e citoplasma mas não na região subsarcolemal. Não foram encontrados filamentos nos casos 1, 2, 7, 8, 10, 11 e 13. A ausência de filamentos em biópsias com vacúolos sugestivos de corpos de inclusão também foi verificada por outros autores [MHIRI & GHERARDI, 1990; SERRATRICE & COL., 1989]. Talvez a falta de filamentos seja decorrente da amostra examinada, pois quase sempre a área vista na microscopia óptica é diferente da preparação da eletrônica. Existem sugestões que se maior número de preparações forem examinadas, com certeza os mesmos serão encontrados [LOTZ & COL., 1989].

Filamentos semelhantes aos descritos na MCIC, foram observados na distrofia oculofaringéica [COQUET & COL., 1990; JAMES & COL., 1992; TOMÉ & COLS, 1989] e

miopatias hereditárias distais [COLE & COL., 1988; ISAACS & COL., 1988; NONAKA & COL, 1981; MATSUBARA & TANABE, 1982,].

IMUNOCITOQUÍMICA

As anormalidades imunológicas são relacionadas com o mecanismo patogênico das miopatias inflamatórias, como nas dermato e polimiosites, sendo que já em 1956, Person, citado por Targoff & Reichlin, induziu miosites em rato por imunização com extratos de músculos [TARGOFF & REICHLIN, 1988].

O mecanismo básico da agressão muscular nas doenças do tecido conjuntivo, pode se fazer por via da imunidade humoral ou celular [CROWE & COL, 1982]. O mecanismo humoral tem sido questionado na patogênese dessas doenças, mas a detecção de complexos imunes, evidenciada pela deposição de imunoglobulinas nas fibras musculares e vasos, vem contra esta hipótese, principalmente nas dermato e polimiosites. A simples deposição ou a presença desses complexos imunes, não é suficiente para determinar a lesão, sendo considerada por alguns como inespecíficos, não tendo relação com os achados anatomopatológicos [ISENBERG, 1983; MASTAGLIA & OJEDA, 1985; OXENHANDLER & COL., 1977; WHITAKER & ENGEL, 1972].

Com a descrição da MCIC como variante da polimiosite, o mecanismo imunológico foi um dos mecanismos invocados para explicar a patogênese da doença [ARAHATA & ENGEL, 1984; RINGEL & COL, 1987; ARAHATA & ENGEL, 1988; ENGEL & ARAHATA, 1984; DALAKAS, 1991]. No presente estudo, como estamos estudando todos os casos que apresentavam corpos de inclusão, procuramos também verificar se existia um mecanismo humoral comum aos diversos tipos de doenças. Tivemos dificuldades na diferenciação quantitativa e qualitativamente da deposição de complemento e imunoglobulinas, nos diferentes tipos de doenças que determinam a produção de corpos de inclusão citoplasmática. Este resultado, vem ao encontro dos trabalhos em doenças neuromusculares e nos que estudaram doenças do colágeno onde o músculo era envolvido com exceção pelas dermato e polimiosites, as alterações encontradas pelos diversos autores, são consideradas inespecíficas, podendo ocorrer em casos de lesões das fibras musculares de diversas etiologias [CROWE & COL., 1982; ISENBERG, 1983; RODRIGUES & COL., 1988], porém outros autores acham que a mesma é específica para as doenças difusas do tecido conjuntivo.[OXENHANDLER & COL. 1977]

Giorno e Colaboradores, comparando a distribuição de linfócitos T entre os infiltrados mononucleares de pacientes com miopatias inflamatórias e não inflamatórias que também tinham infiltrado celular, observaram que existia uma diferença na proporção de células T auxiliares e supressoras entre os dois grupos,

sendo que a proporção de células auxiliares nas miopatias inflamatórias foi mais alta (43 e 26%). [GIORNO & COL, 1984].

Arahata e Engel, estudando casos de dermatomiosite, polimiosite e MCIC, demonstraram que a reação é mediada nas duas últimas pelos linfócitos T com os marcadores citotóxico/supressores, que tem papel preponderante no ataque à fibra muscular [ARAHATA & ENGEL, 1984]. Nessas doenças, o exudato inflamatório por linfócitos CD8+ é predominantemente endomesial e focal, com raras no espaço perivascular, enquanto que predominavam os linfócitos CD4+ no espaço perivascular. Os linfócitos B estavam em pequena proporção no espaço perivascular e praticamente ausentes no endomísio. Consequentemente os índices CD4+/CD8+ foram mais altos no perivascular e mais baixos no endomísio. Os macrófagos foram observados em semelhantes proporções nos dois locais. Houve discreto aumento da proporção de células exterminadoras naturais (NK) no endomísio. O percentual de fibras não necróticas invadidas por mononucleares foi relativamente alta. Os exsudados inflamatórios eram semelhantes na MCIC e polimiosite, porém na região perivascular CD8+ era maior em MCIC. Na distrofia muscular de Duchenne a composição do exsudado inflamatório endomesial foi semelhante ao observado em polimiosite e MCIC, exceto por ter mais células ativadas que na MCIC, com número muito menor [ARAHATA & ENGEL, 1984].

As fibras musculares não necróticas na polimiosite e MCIC estavam invadidas principalmente por células CD8+, enquanto que os linfócitos CD4+ e macrófagos estavam em torno das mesmas. Ocorreu uma inversão do gradientes CD4+/CD8+ para CD8+/CD4+. Por outro lado, nas fibras necróticas, a maior invasão era de macrófagos. Esses autores demonstram que as fibras intactas são inicialmente invadidas por célula citotóxica CD8+ em maior proporção, que CD8+ supressoras, mostrando uma parte comum dos produtos do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) classe I com a fibra muscular, que pode reconhecer um antígeno de superfície. Sabe-se, no entanto, que os antígenos alvos para CD8+ são proteínas sintetizadas endogenamente, como os antígenos virais, que estão associados com moléculas da classe I do MHC. As células CD4+ reconhecem proteínas estranhas exógenas internalizadas em células apresentadoras de antígenos (CAA), que se ligam a uma proteína classe II de moléculas do MHC e formam complexos imunogenéticos [KARPATI & COL, 1988]. Estes complexos, expressos na superfície das CAA são reconhecidos pelos CD4+ [ABBAS & COL 1991,]. Por esta razão, os linfócitos CD4+ reconhecem antígenos em associação aos produtos do gene do MHCII e não podem ser diretamente citotóxicos para a fibra músculo. Parece então que os responsáveis pela lesão muscular na MCIC e polimiosite, sejam mediados pelas células T restritas ao MHC [ENGEL & ARAHATA, 1984].

Estudo avaliando a citotoxicidade mediada por células exterminadoras/exterminadoras naturais(N/NK), demonstraram que na MCIC as fibras não-necróticas estavam invadidas por células mononucleares 5,5 vezes maior que as necróticas, ao contrário da distrofia muscular de Duchenne. As fibras necróticas e não necróticas invadidas na polimiosite tinham a mesma proporção. Estes dados sugerem que na MCIC, a citotoxicidade mediada por células é mais importante que a necrose primária da fibra [ARAHATA & ENGEL, 1988].

Na nossa casuística, observamos que os casos 1, 2, 3, e 4, que correspondem aos casos de miosite com corpos de inclusão citoplasmática, o processo inflamatório predominante foi no interstício, sendo menos marcante dentro das fibras musculares e espaço perivascular. Neste casos, houve um predomínio dos linfócitos CD8+ no interstício que dentro das fibras e áreas perivasculares. A presença de células CD4+ também nestes mesmos casos foi maior no interstício que em torno das fibras musculares e espaços perivasculares. As células B foram raramente observadas no interstício e não foram vistas em torno de fibras musculares e espaço perivascular, e que está de acordo com a literatura descrita acima.

Nas outras patologias, foi observando índices de células inflamatórias menores que os encontrados na miosite com corpos de inclusão citoplasmática, porém persistindo o predomínio de células CD8+, praticamente ausência de células B e na neuropatia periférica não foi encontrado nenhum tipo de célula. Não encontramos outros trabalhos na literatura em patologias como as estudadas, para poder comparar. Se procurarmos associar os casos de miopatias distais e de distrofia de cinturas pélvica e escapular com a distrofia muscular de Duchenne citada nos trabalhos de Arahata e Engel, verificamos que os achados são semelhantes, com a presença de maior número de células CD8+ em relação a CD4+, mas em número muito menor que nos casos de MCIC [ARAHATA & ENGEL, 1984].

Também foram encontradas em nossos casos grande proporção de macrófagos no interstício, fibra necrótica perivascular na MCIC, nas miopatias distais e um dos casos de distrofia muscular de cinturas em todos os locais examinados. Nas atrofia espinhais e no outro caso de distrofia muscular de cinturas pélvicas e escapulares foram observados raros macrófagos no interstício, sendo que não foram observados na neuropatia periférica. As células exterminadoras naturais foram observadas no interstício da maioria dos casos de miosite com corpos de inclusão e mais raramente nos casos de atrofia espinhal, miopatias distais e distrofia muscular de cinturas pélvica e escapular. A relação de células de CD8+/CD4+ foi maior na região perivascular e em torno de fibras necróticas, que no interstício das fibras, nos casos de miosite por corpos de

inclusão citoplasmática. Nas demais entidades patológicas, a relação de células CD8+/CD4+ foi maior nas regiões perivasculares da distrofia muscular de cinturas. Exceto pelos trabalhos de Engel e Arahata, que encontraram padrão semelhante na MCIC [ARAHATA & ENGEL., 1984; ENGEL & ARAHATA., 1984], raros trabalhos aparecem na literatura porém não foi possível uma melhor avaliação [RINGEL & COL., 1987]. Mas acreditamos que o processo seja semelhante no que diz respeito à necrose das fibras musculares, não existindo um processo citotóxico de origem imunológica primária.

ASPECTOS CLÍNICOS

A presença de herança familiar autossômica dominante [FARDEAU & COL, 1990; KLINGMAN & GIBBS, 1991; NEVILLE & COL., 1992] e autossômica recessiva [ARGOV & YAROM, 1984; MASSA & COL., 1991] foi descrita em MCIC, porém há autores que relatam como um dos critérios diagnósticos de MCIC a ausência de história familiar [LOTZ & COL., 1989].

Dos 16 casos, quatro foram classificados como miosites por corpos de inclusão citoplasmática pois apresentavam início da doença tardio ou na idade adulta [LOTZ & COL., 1989; MHIRI & GHERARDI, 1990; SAYERS & COL., 1992], ausência de história familiar [LOTZ & COL., 1989], início insidioso com evolução lenta [CALABRESE & COL, 1987; CARPENTER & COL., 1978; EISEN & COL., 1983; LOTZ & COL., 1989, RINGEL & COL., 1987], redução da força muscular proximal [CALABRESE & COL. 1987; LOTZ & COL., 1989]. As enzimas séricas de origem muscular estavam normais [CARPENTER & COL., 1978; EISEN & COL, 1983; KETELSEN, 1987; LOTZ & COL., 1989; MHIRI & GHERADI, 1990; RINGEL & COL, 1987; SERRATRICE & 1989] ou com elevação moderada (até 10 vezes do limite normal) [CALABRESE & COL.,1987; LOTZ & COL., 1989]. As eletromiografias mostraram padrão miopático [CARPENTER, 1983; JULIEN & COL., 1982; JOY & COL., 1990; KETELSEN, 1987; LAZARO, & COL., 1986; LINDENBERG & COL., 1991; MASSA & COL., 1991; MHIRI & GHERARDI, 1990; RIGGS & COL., 1984; RINGEL & COL., 1987; SAYERS & COL.,1993; SERRATRICE & COL., 1989], padrão neuropático [EISEN, 1983; MHIRI & GHEARADI,1990; RINGEL & COL, 1987; SERRATRICE & COL.,1989; SAYERS & COL.,1992] ou mistas (neuromiopáticas) [CARPENTER, 1983; ENGEL, 1986 p.1423-1438; JULIEN & COL., 1982; JOY & COL., 1990; ; LINDENBERG & COL., 1991; MASSA & COL., 1991; MHIRI & GHERARDI, 1990; RINGEL & COL., 1987; SAYERS & COL., 1993; SERRATRICE & COL., 1989; SHIELDS & COL., 1989; VERMA & COL., 1991; WERNECK., 1991]. Nos critérios histológicos, notamos que todos apresentavam em pequeno aumento, um ou mais vacúolos e um ou mais grupos de fibras atroficas e presença de infiltrado inflamatório endomesial [CALABRESE & COL, 1987; LOTZ & COL 1989]. Dois dos casos apresentaram os filamentos típicos descritos na literatura, sendo que em dois não foi possível a identificação pois a detecção depende do espécimen examinado, número de fragmentos e tempo de exame (Andrew Engel, informações no XLV Meeting of the American Academy of Neurology). A presença do aspecto histológico típico pode também surgir apenas com a evolução, sendo os casos na fase inicial classificados muitas vezes como

polimiosite e somente a repetição da biópsia irá dar o diagnóstico correto [BIRD, 1992]. Também, para tentar resolver esta questão, foram sendo desenvolvidas técnicas de microscopia eletrônica, a partir de fragmentos de material congelado e corado no tricromo de Gomori modificado, onde determinados vacúolos eram especificamente examinados [ASKANAS & ALVAREZ, 1992]. A imunocitoquímica mostrou reação inflamatória, com predomínio de células CD8+, que ocorrem em diversas doenças mediadas por células citotóxicas [ARAHATA & ENGEL, 1984], sendo que a mesma reação ocorre em casos de polimiosite, com a reação imunológica celular muito semelhante entre as duas entidades [ARAHATA & ENGEL, 1984; ARAHATA & ENGEL, 1988a; ENGEL & ARAHATA, 1984].

Três casos foram classificados como miopatias distais com vacúolos marginados pois apresentavam clinicamente atrofia e fraqueza predominantemente distal com história familiar, eletromiografia miopática.. Nas biópsias musculares predominaram os caracteres para miopatia, como refere a literatura [MARKSBERY & COL., 1977; MARTIN & COL., 1982; NONAKA & COL., 1985]. Também nas miopatias distais com vacúolos marginados foram encontrados filamentos intracitoplasmáticos e intranucleares, como os observados no caso 12 [NONAKA & COL., 1985].

Dois de nossos casos caracterizaram-se por apresentar clínica e história familiar compatíveis com distrofia muscular de cinturas pélvicas e escapulares apresentando filamentos intracitoplasmáticos e intranucleares, como já foi relatado na literatura. Na verdade, os vacúolos fizeram com que autores os chamassem de MCIC, sendo que já houve relatos de casos de distrofia muscular de Becker com vacúolos marginados [MASSA & COL., 1991; VISSER & COL., 1990].

Seis casos foram caracterizados como atrofia muscular espinhal juvenil por apresentarem história clínica, familiar e biópsia muscular com desinervação evidente. Embora a creatinoquinase estivesse aumentada nos casos 6 e 8, níveis semelhantes foram descritos nas atrofias espinhais [MIKOL & COL., 1988; TSUKAGOSHI & COL., 1966]. Dos seis casos, três apresentaram filamentos, sendo que dois dos casos estavam no núcleo e citoplasma (casos 5 e 6) e um caso somente no citoplasma (caso 9). Casos com formas clínicas de atrofias espinhais e filamentos intracitoplasmáticos ou nucleares também foram descritos, mas devido aos vacúolos sugerindo corpos de inclusão, foram classificados como miosite por corpos de inclusão citoplasmática, apesar de não terem nenhuma reação inflamatória na histologia. E não existe descrição de imunocitoquímica nas atrofias espinhais [FUKURAHARA & COL., 1980; SERRATRICE & COL., 1989].

O caso 16 clinicamente apresentou polineuropatia sensitiva e motora, cuja etiologia não foi determinada. Neste caso, foram observados filamentos intracitoplasmáticos e intranucleares. Nenhuma reação inflamatória foi observada.

A relação de neuropatia com MCIC já foi detectada variando muito a etiologia [LOTZ & COL., 1989; MHIRI & GHERARDI, 1990].

Também a literatura relata a associação de corpos de inclusão citoplasmática com outras doenças, como pneumonitis intersticial [LOTZ & COL., 1989], dermatomiosite [LOTZ & COL., 1989; LANE, 1985], sarcoidose [DANON & COL., 1986; MHIRI & GHERARDI, 1990], lupus eritematoso sistêmico [YOOD & COL., 1985; LOTZ & COL., 1989], esclerodermia [SALAMA & COL., 1980], síndrome de Sjögren [CHAD & COL., 1982; GUTMANN & COL., 1985] e trombocitopênia imune crônica [RIGGS & COL., 1984], diabetes melitus [DANON & COL., 1982; LOTZ & COL., 1989], parkinsonismo, alcoolismo crônico, doença de Paget [DANON & COL., 1982], síndrome de Sjögren e deficiência de vitamina B12 [KHRAISHI & COL., 1992].

Como podemos verificar, além dos nossos casos, existem relatos de miosite por corpos de inclusão, com aspecto muito heterogeneo com respeito a idade de início, apresentação clínica, padrão de herança, alterações eletrofisiológicas, histológicas e imunocitoquímicas distintas, sugerindo a possibilidade de que os corpos de inclusão possam ser na verdade uma reação inespecífica das células musculares de determinados pacientes a um mesmo estímulo patogênico.

CONCLUSÕES

- 1- Os filamentos intracitoplasmáticos e intranucleares foram encontrados em pacientes com clínica, eletrofisiologia, histologia e imunocitoquímica diferentes, sugerindo que não são específicos para uma única entidade.
- 2- A presença de processo inflamatório importante auxilia na diferenciação das miosites com corpos de inclusão citoplasmática das demais doenças que também apresentam corpos de inclusão citoplasmática na histologia.
- 3- A dosagem sérica da creatinoquinase não auxilia na diferenciação das miosites com corpos de inclusão citoplasmática das demais doenças aqui estudadas.
- 4- O padrão eletromiográfico da miosites com corpos de inclusão citoplasmática não se diferencia das outras doenças aqui estudadas.
- 5- Existiu um predomínio de células T no interstício, principalmente nas miosites com corpos de inclusão citoplasmática, exceto na polineuropatia periférica, sugerindo que existe um mecanismo imunológico primário ou secundário na patogênese das doenças aqui estudadas.

CONCLUSÕES

- 6- A média geral do número de linfócitos CD8+ /mm² por doença estudadas foi maior no interstício nas miosites com corpos de inclusão citoplasmática que nas demais doenças, sugerindo que existe uma relação da mesma com o complexo de histocompatibilidade maior (MCH1), um dos responsáveis pela resposta imunológica.
- 7- Houve uma inversão na proporção de células CD4+/CD8+ para CD8+/CD4, mais importante nos casos de miosite com corpos de inclusão citoplasmática, sugerindo uma reação citotóxica mediada pelo complexo de histocompatibilidade maior (MCH1).
- 8- As imunoglobulinas IgM, IgA, IgG e complemento foram detectadas com maior frequência nas miosites com corpos de inclusão citoplasmática que nas outras doenças aqui estudadas.
9. Os corpos de inclusão citoplasmática ocorreram em pacientes com idades diferentes, com e sem história familiar, com apresentação clínica variável, sem padrão eletrofisiológico similar, com aspectos histológicos diferentes, relações imunocitoquímicas variáveis e ocorrência esporádica na microscopia eletrônica, sugerindo que podem ser uma reação celular inespecífica, surgindo em doenças diferentes, talvez relacionados com o tempo de agressão à fibra muscular.

REFERÊNCIAS

- ABARBANEL, J.M.; LICHTENFELD, Y.; ZIRKIN, H.; LOUZON, Z.; OSIMANI, A.; FARKASH, P. & HERISHANU, Y. Inclusion body myositis in post-poliomyelitis muscular atrophy *Acta Neurol. Scand.* 1988; 78:81-84.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H. & POBER, J.S. Antigen presentation and T cell antigen recognition. In: *Cellular and molecular immunology*. Philadelphia, W.B. Saunders, 1991, 417 pgs.
- ADAMS, R.D.; KAKULAS, B.A. & SAMAHA, F.A. - A Myopathy with cellular inclusions. *Trans. Am. Neurol. Assoc.* 1965; 90:213-216.
- ARAHATA, K. & ENGEL, A.G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies I. Quantitation of subsets according to diagnosis and sites of accumulation and demonstration and counts of muscle fibers invaded by T cells. *Ann. Neurol.* 1984 16:193-208.
- ARAHATA, K. & ENGEL, A.G. A. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. V: Identification and quantitation of T8+ cytotoxic and T8+ suppressor cells. *Ann. Neurol.* 1988a, 23:493-499.
- ARAHATA, K. & ENGEL, A.G. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies. IV: Cell-mediated cytotoxicity and muscle fiber necrosis. *Ann. Neurol.* 1988b, 23:168-173.
- ARGOV, Z. & YAROM, R. "Rimmed vacuole myopathy" sparing the quadriceps. *J. Neurol. Sci.* 1984; 64:33-43.
- ASKANAS, V. & ALVAREZ, R.B. Fast and reliable new method for electron-microscopic identification of cytoplasmic tubulo-filaments in biopsies of patients with inclusion-body myositis. *Acta Neuropathol.* 1992, 84:335-336.
- ASKANAS, V.; ENGEL, K. & ALVAREZ, R.B. Light and electron microscopic localization of beta-amyloid protein in muscle biopsies of patients with inclusion-body myositis. *Am. J. Pathol.* 1992a, 141:3136.
- ASKANAS, V.; SERDAROGLU, P.; ENGEL, K. & ALVAREZ, R.B. Immunolocalization of ubiquitin in muscle biopsies of patients with inclusion body myositis and oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurosc. Lett.* 1991: 130:73-76.
- ASKANAS, V.; SERDAROGLU, P.; ENGEL, K. & ALVAREZ, R.B. Immunocytochemical localization of ubiquitin in inclusion body myositis allows its light-microscopic distinction from polymyositis. *Neurology* 1992b, 42:460-461.
- ASKANAS, V.; ENGEL, K. & ALVAREZ. Beta-amyloid protein immunoreactivity in muscle of patients with inclusion-body myositis. *Lancet* 1992, 339:560-561.
- BECKET, E.B. & BOURNE, G.H. Some histochemical observations on human dystrophic muscle. *Science* 1957a, 126:357-358.

- BECKET, E.B. & BOURNE, G.H. The histochemistry of normal and abnormal human muscle. **Proc. R. Soc. Med.** 1957b, 50:308-312.
- BECKET, E.B. & BOURNE, G.H. Histochemical observations on the cytochrome oxidase and succinic dehydrogenase activity of normal and diseased human muscle. **Acta Anat.** 1958a, 53:289-298.
- BECKET, E.B. & BOURNE, G.H. Acid and alkaline phosphatase in normal and diseased human muscle. **Acta Anat.** 1958b, 35:326-343b.
- BENKE, B. Mass Occurrence of multilamellar bodies in myopathy. **Virchows Arch. (Cell Pathol.)** 1976, 20:77-84
- BHAGAVATI, S.; EHRLICH, G.; KULA, R.W., KWOK, S., SNINSKY, J.; UDANI, V.; & POIESZ, B.J. Detection of human T-cell lymphoma/leukemia virus type I DNA and antigen in spinal fluid and blood of patients with chronic progressive myelopathy. **N. Engl. J. Med.** 1988, 318:1141-1147.
- BILAK, M.; ASKANAS, V. & ENGEL. Strong immunoreactivity of alpha-antichymotrypsin co-localizes with beta-amyloid protein and ubiquitin in vacuolated muscle fibers of inclusion-body myositis. **Acta Neuropathol.** 1993, 85:378-382.
- BIRD, S.J. Inclusion body myositis: Diagnostic value of repeat biopsy. **Muscle & Nerve** 1992, 15:1206-1297.
- BROWN, W.F. & GILLIATT, R.G. **The physiological and technical basis of electromyography.** Boston, Butterworth Publishers 1984. 507 pgs.
- BUCHTHAL, F. **An Introduction to Electromyography.** Gyldendal-Kopenhagen, Scandinavian University Books, 1957
- BUCHTHAL, F. Electrophysiological signs of myopathy as related with muscle biopsy. **Acta Neurol.** 1977, 32:1-29.
- CALABRESE, L.H.; MITSUMOTO, H. & CHOU, S. Inclusion body myositis presenting as treatment-resistant polymyositis. **Arthritis Rheum.** 1987, 30:397-403.
- CAMPBELL M.J. Motor neuron disease. In: WALTON, J. **Disorders of voluntary muscle**, 5 ed. Edinburgh:Churchill Livingstone, 1988 pg 754-792.
- CARPENTER, S.; KARPATI, G.; HELLER, I. & EISEN, A. Inclusion body myositis: A distinct variety of idiopathic inflammatory myopathy. **Neurology** 1978; 28: 8-17.
- CHAD, D.; GOOD, P.; ADELMAN, L.; BRADLEY, W.G.; & MILLS, J. Inclusion body myositis associated with Sjögren's syndrome. **Arch. Neurol.** 1982, 39:186-188.
- CHOU, S.M. Myxovirus-like structures in a case human of chronic polymyositis. **Science** 1967, 158:1453.
- CHOU, S.M. Myxovirus-like structures and accompanying nuclear changes in chronic polymyositis. **Arch. Pathol.** 1968; 86:649-658.

- CHOU, S.M. & MIZUNO, Y. Inclusion body myositis : A chronic persistente mumps myositis ? **Hum. Pathol.** 1986, 17:765-777.
- COLE, A.J.; KUZNIECKY, R.; KARPATI, G.; CARPENTER, S.; ANDERMANN, E. & ANDERMANN, F. Familial myopathy with changes resembling inclusion body myositis and periventricular leucoencephalopathy. **Brain** 1988; 111:1025-1037.
- COQUET, M. VITAL, C. & JULIEN, J. Presence of inclusion body myositis-like filaments in oculopharyngeal muscular dystrophy. Ultrastructural study of 10 cases. **Neuropathl. Appl. Neurobiol.** 1990, 16:393-400.
- CORNELIO, F. & DONES, I. Muscle fiber degeneration and necrosis in muscular dystrophy and other muscle diseases: Cytochemical and immunocytochemical data. **Ann. Neurol.** 1984; 16:649-701.
- CROWE, W.E.; BOVE, K.E.; LEVINSON, J.E. & HILTON, P.K. Clinical and pathogenetic implications of histopathology in childhood polydermatomyositis. **Arthritis Rheum.** 1982, 25:126-39.
- CULLEN, M.J; JOHNSON, M.A & MASTAGLIA, F.L. Pathological reactions of skeletal muscle. In MASTAGLIA, F.L & WALTON, J.N. **Skeletal Muscle Pathology**.Edinburg: Churchill Livingstone, 1992 p.123-184.
- DALAKAS, M.C. Polymyositis, dermatomyositis and inclusion-body myositis. **N. Engl. J. Med.** 1991; 325:1487-1498.
- DANON, J. D.; REYS, M. G.; PERURENA, O. H.; MASDEU, J. C. & MANALIGOD, J.R. Inclusion body myositis. A corticosteroid resistant idiopathic inflammatory myopathy.**Arch. Neurol.** 1982; 39: 760-764.
- DESMET, J.E. & BORENSTEIN, S. Relationship of spontaneous fibrillation potentials to muscle fibre segmentation in human muscular dystrophy. **Nature** 1975, 258:531-534.
- DIMITRIU, D. & NEWELL-EGGERT, M. Inclusion body myositis. **Am. J. Phys. Med. Rehabil.** 1990, 69:2-5.
- DUBOWITZ, V. Pathology of experimentally re-innervated skeletal muscle. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.** 1967, 30:99-110.
- DUBOWITZ, V. **Muscle Biopsy. A Pratical Approach** , 2nd. Ed.. London, Bailliere Tindall 1985.
- DUCHENNE, G.B. Recherches sur la paralysia musculaire pseudo-hipertrophique ou paralysie myo-sclérosique. Article 1er. **Gen. Méd. (Paris)** 1868; 11:305-321.
- EDSTROM, L.; THORNELL, L.E. & ERIKSSON, A. A new type of hereditary distal myopathy with characteristic sarcoplasmic bodies and intermediate (Skeletin) filaments. **J. Neurol. Sci.** 1980; 47:171-190 .
- EDSTROM, L. Histochemical and histopathological changes in skeletal muscle in late-onset hereditary distal myopathy (Welander). **J. Neurol. Sci.** 1975; 26:147-157.

- EISEN, A.; BERRY, K. & GIBSON, G. Inclusion body myositis (IBM): Myopathy or neuropathy ? **Neurology** 1983; 33:1109-1114.
- ENGEL, A.G. & ARAHATA, K. Monoclonal antibody analysis of mononuclear cells in myopathies II. Phenotypes of autoinvasive cells in polymyositis and inclusion body myositis. **Ann. Neurol.** 1984; 16:209-215.
- ENGEL, A.G. Vacuolar myopathies: Multiple etiologies sequential structural studies. In Pearson, CM, Mostofi FK: **The Striated Muscle**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1972, p. 301-343.
- ENGEL A.G. & BANKER, B.Q. Basic reactions of muscle. In :ENGEL, AG. & BANKER, **Myology. Basic and clinical**. New York: McGraw-Hill 1986a .
- ENGEL A.G. & BANKER, B.Q. Ultrastructural changes in diseased muscle. In :ENGEL, AG. & BANKER, **Myology. Basic and clinical**. New York: McGraw-Hill 1986b.
- ENGEL, A. & BIESECKER, G. Complement activation in muscle fiber necrosis: Demonstration of the membrane attack complex of complement in necrotic fibers. **Ann. Neurol.** 1982; 12:289-296.
- ENGEL, K., Focal Myopathic changes produced by electromyographic and hipodermic needles. **Arch. Neurol.** 1967, 16:509-511.
- ERB, W. Dystrophia muscularis progressiva. Klinische und pathologisch-anatomische studien. **Deutsch. Z. Nervenheilk** 1891; 1:173-261.
- FARDEAU, M.; ASKANAS, V.; TOMÉ, F. ENGEL, K.; ALVAREZ, R.; MCFERRIN, J. & CHEVALLAY, M. Hereditary neuromuscular disorder with inclusion body myositis-like filamentous inclusions: clinical, pathological, and tissue culture studies. **Neurology** 1990, suppl1:120.
- FIDZIÁNSKA, A. Virus-like structures in muscle in chronic polymyositis. **Acta Neuropathol.** 1973, 23:23-31.
- FITZSIMONS, R. & SEWRY, C.A. Immunocytochemistry. In:DUBOWITZ, V. **Muscle Biopsy. A Pratical Approach** 2nda. edition. London, Bailliere Tindall 1985.
- FUKUHARA, N; KUMAMOTO, T. & TSUBAKI, T. Rimmed vacuoles. **Acta Neuropathol.** 1980, 51:229-235.
- FUKUHARA, N. ; KUMAMOTO, T. ; TSUBAKI, T. ; MAYUZUMI, T. & NITTA, H. Oculopharyngeal muscular dystrophy and distal myopathy. intrafamilial difference in the onset and distribution of muscular involvement. **Acta Neurol. Scandinav.** 1982; 65:458-467.
- GIORNO, R.; BARDEN, M.T.; KOHLER, P.F. & RINGEL S. Immunohistochemical characterization of mononuclear cells infiltrating muscle of patients with inflammatory and noninflammatory myopathies. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 1984, 30:405-412.
- GRIESIENGER, W.I. Ueber Muskelhypertrophie. **Arch Heilkund (Leipzig)** 1865, 6:1-13.
- GUTMANN, L.; GOVINDAN, S.; RIGGS, J.E. & SCHOCHET, S.S. Inclusion body myositis and Sjogren's syndrome. **Arch. Neurol.** 1985; 42:1021-1022.

- HUBNER, G. & PONGRATZ, D. Inclusion Body Myositis: An example of diagnostic electron microscopy. **Biol. Cell.** 1980; 39:283-286.
- ISAACS, H.; BADESHORST, M.E. & WHISTLER, T. Autosomal recessive distal myopathy. **J. Clin. Pathol.** 1988, 41:188-194.
- ISENBERG, D.A. Immunoglobulin deposition in skeletal muscle in primary muscle disease. **Q. J. Med.** 1983; 207:297-310.
- JAMES, G.L.; OH, S.J.; FESENMEIER, J.T.; THOMAS, H.F; & DANNON, N.J. Oculopharyngeal involvement in a myopathy with rimmed vacuoles: oculopharyngeal muscular dystrophy or inclusion body myositis?. **Muscle & Nerve** 1992, supl: pg 1207.
- JOY, J.L. ;OH J. SHIN & BAYSAL, A.I. Electrophysiological spectrum of inclusion body myositis. **Muscle & Nerve** 1990, 13:949-951.
- JULIEN, J.; VITAL, C.L.; LAGUENY, A. & SAPINA, D. Inclusion body myositis. **J. Neurol. Sci.** 1982; 55:15-24.
- KARPATI, G. & ENGEL, W.K. "Type grouping" in skeletal muscles after experimental reinnervation. **Neurology** 1968, 18:447-455
- KARPATI, G.; POULIOT, Y. & CARPENTER, S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscle. **Ann. Neurol.** 1988; 23:64-72.
- KELLY, J.J.; MADOC-JONES, H.;ADELMAN, L.S ;ANDRES, P.L. & MUNSAT, T.L. Total body irradiation not effective in inclusion body myositis. **Neurology** 1986; 36:1264-1266.
- KETELSEN, U.P. Inclusion body myositis. Histochemical and ultrastructural aspects. **Acta Neurol Latinoamer.** 1987; 30:134-135.
- KHRAISHI, M.M.; JAY, V. & KEYSTONE, E.C. Inclusion body myositis in association with vitamin B12 deficiency and Sjögren syndrome. **J. Rheumatol.** 1992, 19:30-309.
- KIMURA, J. **Electrodiagnosis in disease of nerve and muscle: Principles and Practice.** 2nda. edit..Philadelphia, F.A. Davis, 1989, 709 pgs.
- KLINGMAN, J.G. & GIBBS, M.A. Familial inclusion body myositis. **Neurology** 1991, 40(suppl 1):120.
- KUGELBERG, E.; EDSTRÖM, L. & ABBRUZZESE, M. Mapping of units in experimentally reinnervated rat muscle. Interpretation of histochemical and atrophic fibre patterns in neurogenic lesions. **J. Neurol., Neurosurg. Psychiatr.** 1970, 33:319-329.
- LANE, R.J.M. ; FULTHORPE, J.J. & HUDGSON, P. Inclusion body myositis: A case with associated collagen vascular disease responding to treatment. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.** 1985; 48:270-273.
- LINDEBERG, C.; BORG, K.; EDSTRÖM, L. HEDSTRÖM, A. & OLDFORS, A. Inclusion body myositis and Wexler distal myopathy: a clinical, neurophysiological and morphological comparison. **J. Neurol. Sci.** 1991,103:76-81.

- LAZARO, R.P. ; BARRON, K.D. ; DENTINGER, M.P. & LAVA, N.S. Inclusion body myositis: Case reports and a reappraisal of an underrecognized type of inflammatory myopathy. **Mt Sinai J. Med.** 1986; 53:137-144.
- LOTZ, B.P.; ENGEL, A.G.; NISHINO, H.; STEVENS, J.C. & LITCHY, W.J. Inclusion body myositis. Observations in 40 Patients. **Brain** 1989; 112:727-747
- MAIR, W.G.P. & TOMÉ, F.M.S. **Atlas of the ultrastructure of disease human muscle**. Edinburg, Churchill Livingstone, 1972, 249 pgs.
- MARTIN, J.J.R.; CEUTERICK, C.M. & MERCELIS, R.J. Nuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy. **Muscle & Nerve** 1982, 5:735-737.
- MARKESBERY, W.R.; GRIGGS, R.C. & HERR, B. Distal myopathy: Electron miscropsopic and histochemical studies. **Neurology**. 1977, 27:727-735.
- MASSA, R.; WELLER, B.; KARPATI, G.; SHOUBRIDGE, E. & CARPENTER, S. Familial inclusion body myositis among Kurdish - Iranian Jews. **Arch. Neurol.** 1991, 48:519-522.
- MASTAGLIA, F.L. & OJEDA, V.J. Inflammatory myopathies: Part 1. **Ann. Neurol.** 1985, 17:215-227.
- MATSUBARA, S. & TANABE, H. Hereditary distal myopathy with filamentous inclusions. **Acta Neurol. Scandinav.** 1982; 65:363-368.
- MEDICAL RESEARCH COUNCIL, **Aids to the examination of the peripheral nervous system**. London: H.M.S.O. 1976: Memorandum n.45.
- MENDELL, J.R.; SAHENK, Z.; GALES, T. & PAUL, J. Amyloid filaments in inclusion body myositis. Novel findings provide insight into nature of filaments. **Arch. Neurol.** 1991, 48:1229-1234.
- MHIRI, C. & GHERARDI R. Inclusion body myositis in French patients. A clinicopathological evaluation. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** 1990, 16:333-344.
- MIKOL, J. Inclusion body myositis. In :ENGEL, AG. & BANKER, **Myology. Basic and clinical**. New York: McGraw-Hill 1986.
- MIKOL, J.; BOURDARIAS, H.; DELLANAVE, J. & PERIE, G. Familial bulbospinal atrophy in adults. **Rev. Neurol.** 1988, 144:748.
- MIKOL, J.; PAPAICONOMOU, F.; FERCHAL, F.; PEROL, Y.; GAUTIER, B.; HAUGUENAU, M. & PEPIN, B. Inclusion Body Myositis : Clinicopathological studies and isolation of an adenovirus type 2 from musce biopsy specimen. **Ann. Neurol.** 1982; 2:576-581.
- MIZUSAWA, H.; KURISAKI, H. TASATSU, M.; INOUE, K.; MANNEN, T.; TOYOKURA, Y. & NAKANISHI, T. Rimmed vacuolar distal myopathy. An ultrastructural study. **J. Neurol.** 1987, 234:137-145.
- MUNSAT, T.L.; BALOH, R.; PEARSON, C.M. & FOWLER Jr, W. Serum enzyme alterations in neuromuscular disorders. **J. Am. Med. Assoc.** 1973, 226:1536-1543.
- NEVILLE, H.E.; BAUMBACH, L.L.; RINGEL, S.P.; RUSSO, L.S.; SUJANSKY E. & GARCIA, C.A. Familial inclusion body myositis: Evidence for autosomal dominant inheritance. **Neurology** 1992, 42:897-902.

- NISHINO, H.; ENGEL, A.G. & RIMA, B.K. Inclusion body myositis: The mumps virus hypothesis. **Ann. Neurol.** 1989, 25:260-264.
- NONAKA, I.; SUNOHARA, N.; ISHIURA, S. & SATOYOSHI, E. Familial distal myopathy with rimmed vacuole and lamellar (Myeloid) body formation. **J. Neurol. Sci.** 1981 51:141-155.
- NONAKA, I.; SUNOHARA, N.; SATOYOSHI, E. TERASAWA, K. & YONEMOTO, K. Atosomal recessive distal muscular dystrophy: A comparative study with distal myopathy with rimmed vacuole formation. **Ann. Neurol.** 1985, 17:51-59.
- OXENHANDLER, R.; ADELSTEIN, E.H. & HART, M.N. Immunopathology of skeletal muscle. The value of direct immunofluorescence in the diagnosis of connective tissue disease. **Hum. Pathol.** 1971; 8: 321-328.
- PENNINGTON, R.J.T. Biochemical aspects of muscle disease. In WALTON, J., **Disorders of Voluntary Muscle**, Edinburg: Churchill Livingstone, 1981:417-447.
- RODRIGUES, C.J.; CARVALHO, M.S. & LEVY, J.A. Iminofluorescência direta em músculo esquelético de pacientes com doenças neuromusculares. **Rev. Bras. Neurol.** 1988, 24:147-150.
- RIGGS, J.E.; SCHOCHET, S.S.; GUTMANN, L.; MCCOMAS, C.F. & ROGERS, J.S. Inclusion body myositis and chronic immune thrombocytopenia. **Arch. Neurol.** 1984, 41:93-95.
- RINGEL, S. P.; KENNY, C.E.; NEVILLE, H.E.; GIORNO, R. & CARRY, M.R. Spectrum of inclusion body myositis. **Arch. Neurol.** 1987; 44: 1154-1157.
- SALAMA, J.; TOMÉ, F.M.S.; LEBON, P.; MARIE, L.; DELAPORTE, P. & FARDEAU, M. Myosite a inclusions. Étude clinique, morphologique et virologique concernant une nouvelle observation associée à uine sclérodermie généralisée et à un syndrome de Klinefelter. **Rev. Neurol.** 1980, 12:836-878.
- SAYERS, M.E.; CHOU, S.M.; CALABRESE, L.H. Inclusion body myositis: Analise of 32 cases. **J. Rheumatol.**, 1992, 19:1385-1389.
- SERDAROGLU, P.; ASKANMAS, V. & ENGEL, W. Immunocytochemical localization of ubiquitin at human neuromuscular junctions. **Neuropathol. Appl. Neurobiol.** 1992, 18:232-234.
- SERRATRICE, G.; PELLISSER, J.F.; POUGET, J. & FIGARELLA-BRANGER, D. Formes cliniques des myosites à inclusions: 12 cas. **Rev. Neurol.** 1989, 145:781-788.
- SETHI, R.K. & THOMPSON, L.L. **The Electromyographer's Handbook**. Boston, Little, Brown and Compay, second edition, 1989,
- SEWRY, C.A. Ultrastructural Changes in Diseased Muscle. In: DUBOWITZ, V. **Muscle Biopsy. A Pratical Approach** 2nda. edit.. London, Bailliere Tindall 1985, pg 129-183.
- SHAW, R.F.; PEARSON, C.M; CHOWDHURY, S.R. & DREIFUS, F.E. Serum enzymes in sex-linked(Duchenne) muscular dystrophy. **Arch. Neurol.** 1967; 16:115-122.
- SHIELDS, W.R.; WILBOURN, A.J.; LEVIN, K.H.; ESTES, M.L. & CHOU, M.S. Inclusion body myositis: the EMG features. **Neurology** 1989, 39(suppl 1):233

- SOWA, J.M. Human T lymphotropic virus L, myelopathy, polymyositis and synovitis: An expanding rheumatic spectrum. **J. Rheumatol.** 1992, 19:316-318
- SUNOHARA, N. ; NONAKA, I. & KAMEI, N. Distal myopathy with rimmed vacuole formation. A follow-up study. **Brain** 1989; 112:65-83.
- TARGOFF, I.N. & REICHLIN, M. Immunological aspects. In: MASTAGLIA, F.L. **Inflammatory Diseases of Muscle**. London: Blackwell, 1988.
- TARGOFF, I.N. Immunologic aspects of myositis. **Curr. Opin. in Rheumatol.** 1989, 1:432-442.
- TOMÉ, F.M.S.; FARDEAU, M.; LEBON, P. & CHEVALLEY, M. Inclusion body myositis. **Acta Neuropathol.** 1981, suppl. VII:287-291
- TOMÉ, F.M.S.; GOUNON, P.; COLLIN, H.; PLOTON, D.; SHELANSKI, M.L.; FARDEAU, M. Intranuclear inclusions in oculopharyngeal muscular dystrophy (OPMD): further studies. **Neurology** 39(suppl.1) pg 335.
- TOMÉ, F.M.S.; LECLERC, A.; LOPEZ, N.; CHATEAU, D.; ALVAREZ, R.B.; RICHARDET, J.M.; ASKANAS, V. & FARDEAU, M.. Childhood-onset myopathy characterized by cytoplasmic and nuclear inclusions containing 16-18 nm tubulofilaments. **Neurology** 1993 suppl 43:201.
- TSUKAGOSHI, H.; SUGITA, H. & FURUKAWA, T. Kugelberg Welander syndrome with dominant inheritance. **Arch. Neurol.** 1966, 14:378.
- UNCINE, A.; LANGE, D.J.; HAYES, A.P. & LOVALACE, R.E. Long-duration polyphasic motor unit potentials in myopathies: a pathologic correlation. **Neurology** 1987 37 suppl 1 -115.
- VACCARIO, M.L.; SCOPPETTA, C.; BRACAGLIA, R. & UNCINI, A. Sporadic distal myopathy. **J. Neurol.** 1981, 224:291-295.
- VERMA, A.; BRADLEY, W.G.; ADESINA, A.M.; SOFFERMAN, R. & PENDLEBURY, W.W. Inclusion body myositis with cricopharyngeus muscle involvement and severe dysphagia. **Muscle & Nerve** 1991,14:470-473.
- VISSER, M. ;BAKKER, E. ; DEFESCHE, J.C. ; BOLHUIS, P.A. & OMMEM, G.J.V. An unusual variant of Becker muscular dystrophy. **Ann. Neurol.** 1990; 27:578-581.
- WACHSTEIN, M. & MEISEL, E. The distribution of histochemically demonstrable succinic dehydrogenase and of mitochondria in tongue and skeletal muscle. **J. Bophys. Biochem. Cytol.** 1955; 1: 483-487.
- WALTON, J.; GARDENER, D. & MEDDWIN, M. The Muscular dystrophies. In: WALTON, J. **Disorders of Voluntary Muscle**, 5 ed. Edinburgh:Churchill Livingstone, 1988 pg.1166.
- WERNECK, L.C. O Valor da biópsia muscular em neurologia. Análise de 290 exames a fresco e pela histoquímica. **Rev. Bras. Clín. Terap.** 1981; 10 (Suplemento):2-22.
- WERNECK, L.C. **Estudo comparativo entre biópsias musculares e eletromiografias**, São Paulo, 1985, 118 pgs., Tese (Doutorado), Escola Paulista de Medicina.

Referências

- WERNECK, L.C. **Estudo da biópsia muscular em sua relação com enzimas séricas e eletromiografias nas doenças musculares.** Curitiba, 1991. 168 pgs. Tese. (Professor Titular), Universidade Federal Paraná.
- WERNECK, L.C. & LIMA, J.G.C. Muscle biopsy correlated with electromiography. **Arq. Neuropsiquiatr. (São Paulo)** 1988; 46: 156-165.
- WERNECK, L.C.; LIMA, J.G.C. & KOEHLER, H. Correlation between specific histological and eletromyographic findings in neuromuscular disorders. **Arq. Neuropsiquiatr. (São Paulo)** 1988, 46:264-271.
- WHITAKER, J.N. & ENGEL, W.K. Vascular depositis of immunoglobulin and complement in idiopathic inflammatory myopathy. **N. Engl. J. Med.** 1972, 286:333-338.
- WINTZEN, AR; BOTS, G.T; DE BAKKER, H.M; HULSHOF, J.H. & PADBERG, G.W. Dysphagia in inclusion body myositis. **J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.** 1988, 51: 1542-1545.
- YOOD, R.A. & SMITH, T.W. Inclusion body myositis and systemic lupus erythematosus. **J. Rheumatol.** 1985; 12: 568-570.
- YUNIS, E.J. & SAMAHA, F.J. Inclusion body myositis. **Lab. Invest.** 1971; 25:240-248.